

Aus dem Hygienisch-bakteriologischen Institut der Universität Erlangen
Vorstand: Professor Dr. M. Knorr

**Die biologische Reduktion von Triphenyltetra-
zoliumchlorid zu Formazan und seine Abhängigkeit
von der Zusammensetzung des Nährbodens und
dem Alter von E. coli in Wasser**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
an der Friedrich-Alexander-Universität
zu Erlangen



vorgelegt von

Fidelis Selenka

aus Dillingen an der Donau

1958 M 40

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Mai 1957

1. Prüfer: Prof. Dr. *M. Knorr*

2. Prüfer: Prof. Dr. *Flügel*

Lebenslauf

Ich, Fidelis Julius Felix *Selenka*, wurde am 9. Oktober 1930 in Freiwaldau als Sohn des Kunstmalers Julius Selenka und seiner Ehefrau Emmy-Felizitas geboren.

In Neustadt—Oberschlesien besuchte ich die Volksschule und die ersten vier Klassen der Oberschule. Nach kurzer Unterbrechung der Schulausbildung durch Kriegsereignisse 1945 legte ich im Juli 1950 das Abitur an der Oberschule in Dillingen—Donau ab und immatrikulierte mich an der Universität Erlangen zum Studium der Medizin. Hier bestand ich im Februar 1953 mein Physikum und im Juli 1956 mein medizinisches Staatsexamen mit „sehr gut“.

Im 9. und 10. Semester war ich als Doktorand im Hygienischen Institut der Universität tätig. Nach dem Staatsexamen erhielt ich am gleichen Institut eine Stelle als Medizinalassistent. Seit dem 1. 4. 1957 bin ich in der Chirurgischen Universitätsklinik Erlangen tätig.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Hygienisch-bakteriologischen Institut der Universität Erlangen
(Vorstand: Prof. Dr. M. Knorr)

Über die Brauchbarkeit von TTC-Nährböden für die Bestimmung der Coli-Zahl in Wasser

Von F. Selenka

Einleitung

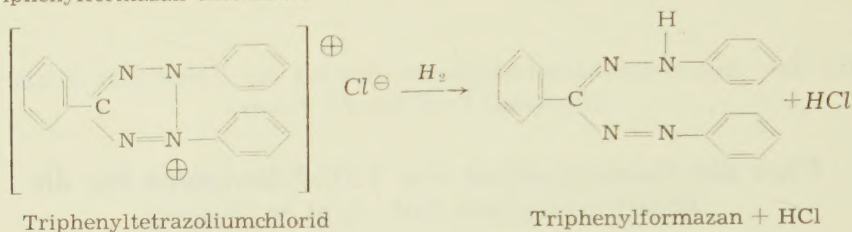
In den letzten Jahren gewann die Anwendung des 2, 3, 5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC) in der gesamten Biologie steigende Bedeutung. Die dem Invertseifenabkömmling TTC eigene Fähigkeit, noch in relativ hoher Konzentration bestimmte Arten aus der Gruppe der gramnegativen Stäbchen von der starken bakteriziden Wirkung auszunehmen, wurde von Schönberg¹⁶⁻²¹ zur Entwicklung eines Selektivnährbodens für coliforme Keime benutzt.

Schönberg verfolgte dabei speziell die Belange der bakteriologischen Milchüberwachung, erwähnte aber auch die Brauchbarkeit des Mediums für die Wasseruntersuchung. Coliforme Keime wachsen auf TTC-haltigem Agar als dunkelbraunrote Kolonien auf klarer Agarschicht, wobei unerwünschte Nebenkeime durch passende Wahl der TTC-Konzentration in erträglichen Grenzen gehalten werden können. Nach Klein⁹ scheint jedoch Vorsicht in Bezug auf die Verlässlichkeit von TTC-Nährböden angebracht. Es ist nötig, das Verhalten des Fäkalindikators *E. coli* unter Bedingungen, die seinem natürlichen Vorkommen weitgehend entsprechen, auf TTC-Agar zu prüfen. Darüber hinaus ist festzustellen, ob die Methodik die nötige Spielbreite aufweist, um bei Durchführung von Routineuntersuchungen durch verschiedene Institute vergleichbare und nicht zu stark von der jeweiligen Laboratoriumstechnik abhängende Werte zu erhalten.

A. Chemie und allgemein biologisches Verhalten des TTC

Das Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), aus der besonders in neuerer Zeit ständig im Wachsen begriffenen Gruppe der Tetrazoliumverbindungen, stellt einen bitter schmeckenden, in Wasser leicht löslichen, in Äther unlöslichen Stoff von verhältnismäßig starker Giftigkeit dar, der in farblosen Nadeln kristallisiert. In gepufferten und ungepufferten Lösungen ruft er keine Änderung der Wasserstoffionenkonzentration hervor. Es ist nötig, diese Messungen mit einer Glaselektrode durchzuführen.

Die wichtigste Eigenschaft des TTC ist seine Reduzierbarkeit. Der Vorgang ist im Gegensatz zu bisher üblichen Redoxverbindungen, wie Methyleneblau und Laktoflavin, irreversibel. Er spielt sich unter biologischen oder milden chemischen Bedingungen unter Aufbrechen der Bindung zwischen den beiden phenylsubstituierten N-Atomen ab und läßt neben Salzsäure das rote Triphenylformazan entstehen:



Das wasserunlösliche Formazan ist durch geeignete Lösungsmittel wie Xylol oder Äther bequem quantitativ zu extrahieren und kolorimetrisch zu bestimmen. Bei stärker wirkenden Reduktionsmitteln wird die Formazanstufe jedoch durchschritten und es werden kolorimetrisch nicht mehr zu erfassende farblose Abbauprodukte erzeugt.

In alkalischer Lösung erfolgt bei einem pH von 9,0 und darüber, eine Formazanbildung durch reduzierende Zellbestandteile wie Ascorbinsäure, Cystin und Glutathion¹² und durch reduzierende organische Substanzen, wie sie die zur Keimzüchtung benützte Nährbouillon enthält². Im neutralen Bereich führt die Einwirkung von kurzzeitigem Licht, in der Praxis von direktem Sonnenlicht, zur Rötung von Nährlösungen und Agarplatten. Im biologischen Geschehen wird jedoch eine kräftige Reduktion schon im Dunkeln und bei pH-Werten beobachtet, die weit unter pH 9,0 liegen. Es handelt sich dabei um die Tätigkeit bestimmter Fermentsysteme, deren formazanbildende Wirkung auch in vitro geprüft werden konnte. Als verantwortliche Systeme werden von mehreren Autoren gelbe Fermente genannt^{2, 4, 8}. Untersuchungen zeigen, daß Organismen auch ohne Vermehrung über die Möglichkeit verfügen, kleinere Mengen TTC zu reduzieren¹¹. Der dafür benötigte Wasserstoff scheint auch bei sehr träger Stoffwechsellaage reduziert vorliegenden gelben Fermenten zu entstammen. Eine Formazanbildung dieser Art wird als „endogene Reduktion“ bezeichnet. Bei Anwesenheit eines für dehydrierende Umsetzungen brauchbaren Stoffes entstehen zusätzliche Mengen Formazan, wobei von einer „substratabhängigen Reduktion“ gesprochen werden kann.

Eine andere wichtige Eigenschaft des TTC stellt seine vitalitätsschädigende Wirkung auf Organismen aller Art dar. Nach Lettre¹³ führt noch eine Konzentration von 1:100 000 bei tierischen embryonalen Zellen zu einer Wachstumshemmung. Demgegenüber sind Meerestiere³, pflanzliche Zellen¹⁴ und einige Bakterienarten weit weniger empfindlich. Wundt²² berichtet, daß alle Bakterien in der Lage sind, TTC zu Formazan zu reduzieren, wenn ihnen der Stoff in einer für sie ungiftigen Menge angeboten wird. Bei Überschreitung einer für die einzelnen Arten unterschiedlichen Toleranzgrenze tritt nach 24-stündiger Bebrütung kein Wachstum mehr auf. Es handelt sich dabei aller Wahrscheinlichkeit nach um eine Bakterizidie, denn die bei höheren TTC-Konzentrationen klargebliebenen Bouillonröhrchen zeigen nach Ausimpfen auf andere Nährböden kein Wachstum mehr. Die Coli-Aerogenes-Gruppe sowie die TPE-Gruppe stehen nach diesen Angaben hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber TTC an der Spitze aller geprüften Stämme. Schönberg¹⁷ nahm diese Arbeiten zum Ausgang eigener Untersuchungen über die Brauchbarkeit eines TTC-haltigen Mediums zum selektiven Nachweis von coliformen Keimen.

B. Bisherige Erfahrungen mit TTC in der Diagnostik der Coliformen

Nach Schönberg¹⁸⁻²¹ ist ein TTC-Agar 1:450 mit 0,5 % Laktosezusatz zu einem üblichen Nähragar sehr gut zum Nachweis coliformer Keime geeignet. Auf Grund ausführlicher Studien stellt er eine Überlegenheit gegenüber bisher üblichen Standardmethoden infolge eines guten Kontrastes der dunkelroten TTC-Kolonien gegen den klaren Agarhintergrund und infolge weitgehender Hemmung von störenden Nebenkeimen fest. Harms und Wegener⁷ veröffentlichten in der Folgezeit Ergebnisse mit diesem Medium bei der Kontrolle von Vorzugsmilch. Sie fanden dabei ein Überwiegen der TTC-Keimzahlen für Coliforme gegenüber Bromthymolblau-Trypaflavin-Laktose-Agar in 8 % der Proben und nur in 2 % eine Unterlegenheit. Im Gegensatz zu diesen Autoren und auch zu Schönberg¹⁹, welcher unter den nachgewiesenen Keimen 60 % *E. coli*, 30 % *A. aerogenes* und 10 % Intermedius einschließlich sonstigen Keimen feststellt, zeigen vergleichende Untersuchungen von Klein⁹, daß der Anteil der ebenfalls aus Milchproben stammenden Coli-Keime wesentlich geringer, nämlich zu 8,7 % ausfallen kann, während *Aerogenes*-Keime 24,5 % betragen und der Rest von Intermedius, Fluoreszenten und Alkalibildnern gebildet wird.

Seine Untersuchungen über die Ursache dieser offensichtlich zu niedrigen Keimzahlen von *E. coli* lassen unter Verwendung von Keimaufschwemmungen von *E. coli* erkennen, daß bereits bei der TTC-Konzentration 1:450 eine starke Hemmung stattfindet. Um z. B. das gleiche Wachstum, wie es auf gewöhnlichem Agar auftritt, auch auf TTC-Platten zu erreichen, ist eine Herabsetzung der Coli-Verdünnung von 10^{-8} auf 10^{-2} nötig, mit anderen Worten, auf dem von Klein geprüften TTC-Agar erzeugt nur jeder millionste Keim eine Kolonie. Ein Stamm von *A. aerogenes* wird dagegen überhaupt nicht gehemmt, Intermedius und Alkalibildner nur im Bereich einer Zehnerpotenz. Fluoreszenten nehmen mit der Entwicklung etwa jedes tausendsten Keimes auf TTC-Platten eine Mittelstellung ein. Die Ergebnisse blieben nicht unwidersprochen. Untersuchungen von Seelmann und Wegener²² bestätigten erneut die früheren Befunde von Harms und Wegener⁷ und führten bei einer Wiederholung der eben erwähnten Versuche von Klein bei scheinbar gleicher Versuchsanordnung zu einer offensichtlichen Diskrepanz. Es wird hier bei 3 geprüften Stämmen von *E. coli* in den steigenden Verdünnungen (10^{-10} bis 10^{-13}) stets das ihnen entsprechende Wachstum auf TTC-Agar 1:450 und Nähragar in gleicher Kolonienzahl festgestellt.

Solche unterschiedliche Ergebnisse scheinen von Faktoren abzuhängen, die beim Nachweis von Wasserkeimen auf TTC--Nährböden eine große Rolle spielen und in einer folgenden Arbeit noch ausführlich besprochen werden sollen.

Im Ausland empfehlen Gargani und Marraccini⁶ einen TTC-Agar 1:500 als Nährboden für die Milch und Wasseruntersuchung obwohl nur Milchproben überprüft werden. Sie ergeben, an einer Standardmet-

hode gemessen, gute Resultate. Untersuchungen von *Borneff* und *Frobel*³ aus unserem Institut über die Brauchbarkeit des Bacto-strip-Verfahrens zeigen, daß im Mittel nur 50% der echten Fäkal-Coli des Endo-Agars auf diese Weise aus Milch zu erfassen sind!

Auch in Trink- und Abwasser liegen die nachgewiesenen Coliformenzahlen auf Bacto-strip-Streifen unter dem Vergleichsmedium. Da beim Nachweis von Wasserkeimen sicher gewisse Parallelen zwischen der Wirkungsweise eines TTC-Agars und dem Bacto-strip-Verfahren bestehen, erscheint in Erwähnung dieses Tetrazol-Verfahrens angezeigt.

In dem Schrifttum ist das Hauptaugenmerk fast ausschließlich auf die Untersuchung von Milch gerichtet. Wo von der Anwendung eines TTC-Mediums für die Wasseruntersuchung die Rede ist, erfolgt dies nur in Form von Analogieschlüssen. Vergleiche zwischen verschiedenen Medien, wie sie in der Coli-Diagnostik des Wassers üblich sind, und TTC-Medien sind offenbar noch nicht angestellt. Notwendigerweise wird sich dabei auch ein Unterschied in der Beurteilung der Ergebnisse nicht umgehen lassen, da in der Milchwirtschaft das Bestreben vorherrscht, alle Keime der Coli-Aerogenes-Gruppe zu erfassen und darüber hinaus andere Gramnegative wie Fluoreszenten u. s. w., in die Keimzahlen miteinzubeziehen, während für die Beurteilung des Wassers in erster Linie *E. coli* maßgebend ist. Wie *Knorr*¹⁰ betont, können die dabei gleichzeitig nachgewiesenen Keime von *E. freundii* und *A. aerogenes* nur als Sicherheitszuschlag hingenommen werden.

Die Brauchbarkeit des TTC-Agars zur bakteriologischen Kontrolle von Wasser wird daher von seiner Fähigkeit anhängen, *E. coli*, und zwar den Fäkaltyp, möglichst ungehindert sich entwickeln zu lassen.

C. Eigene Versuche

1. Allgemeine Methodik:

Bei allen Versuchen kam gemäß den Vorschriften der „Amerikanischen Einheitsverfahren zur Untersuchung von Wasser“¹ ein Fleischextraktagar zur Anwendung. Er enthielt:

- 10,0 g Liebig's Fleischextrakt
- 10,0 g Pepton Merck (aus Fleisch)
- 3,0 g NaCl
- 2,0 g K_2HPO_4
- 30,0 g Agar-Agar
- 1 000,0 ccm Aqua dest.

Das vor dem Autoklavieren auf 8,0 eingestellte pH betrug nach zweimaligem Sterilisieren von 45 Min. Dauer bei 1 Atmosphäre zwischen pH 7,2 und 7,4.

Mit den Substraten erfolgte in der von *Schönberg*²¹ angegebenen Weise die Herstellung des TTC-Agars.

Die genauere Einstellung der erforderlichen Wasserstoffionenkonzentration geschah unmittelbar vor dem Ausgießen zu Platten durch Zugabe von n-Natronlauge bzw. von 10%iger Salzsäure. Zur Kontrolle des pH-Wertes bewährte

sich ein in seiner Wirksamkeit durch ionometrische Messungen mittels Glaselektrode geprüftes Lyphanpapier Nr. 664 und 668. Dabei ist jedoch zu beachten, daß die Messungen nicht nach dem TTC-Zusatz erfolgten, da die im Indikatorpapier enthaltenen Farbstoffe deutliche Veränderungen erleiden und einen pH-Wert angeben, der den Tatsachen nicht entspricht. So zeigt z. B. ein eben mit pH 6,1 bestimmter Agar nach TTC-Zugabe einen pH-Wert von 5,2 an, obgleich sich der ionometrisch mit Hilfe einer Oberflächenglaselektrode festgestellte Wert von 6,1 nicht verändert hat.

Das zu den Versuchen verwandte 2, 3, 5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid stammte von der Firma Bayer, Leverkusen und trug die Partienummern D 60250 und H 45847.

Als Vergleichsmedien dienten Nähragar mit 0,5% Laktose oder Endo-Agar mit gleichem Agar-Agargehalt wie die benutzten TTC-Platten. Die zu den Untersuchungen benutzten Keime stammten aus Oberflächenwasser, Fäzes und aus Reinkulturen in Dextrose-Bouillon.

Oberflächenwasser wurde in sterilem Gefäß entnommen, in Peptonwasser unter Verwendung eines Magnetrührers verdünnt und innerhalb der ersten halben Stunde nach der Entnahme auf die vorbereiteten Agarplatten aufgebracht. Peptonwasser hatte sich gemäß Arbeiten von Knorr¹⁰ als Verdünnungsmittel vor allem bei der Homogenisierung von keimhaltigen Untersuchungsgut im Mixgerät als geeignet erwiesen. Stuhlproben wurden nach diesem letzteren Verfahren aufgeschlossen und wie Oberflächenwasser weiterbehandelt. Reinkulturen kamen nach 4- bzw. nach 18-stündigem Wachstum in Dextrose-Bouillon zur Verdünnung.

Die bei allen Versuchen benutzten Geräte und Verdünnungsflüssigkeiten besaßen Raumtemperatur.

Das Aufbringen der Keime auf die Agarsubstrate erfolgte nach 2 Methoden. Einmal wurden 0,5 ccm Untersuchungsflüssigkeit einfach aufgetropft, mit Hilfe eines Drigalskispatels verteilt, und im Brutschrank mit teilweise geöffnetem Deckel solange getrocknet, bis die Flüssigkeit eben verschwand, zum anderen erhielten die mit 0,5 ccm Untersuchungsflüssigkeit versehenen Platten in Abwandlung des Rauchschen Verfahrens¹⁵ einen Schichtguß mit 2,5 ccm $\frac{1}{2}$ %igem Agar von 48°. Der Schichtgußagar für TTC-Platten erhielt einen TTC-Zusatz, der unter Einrechnung der hinzukommenden 0,5 ccm Untersuchungsflüssigkeit der TTC-Konzentration der Platten entsprach. Bei Versuchen, die verschiedene pH-Stufen und Salzkonzentrationen im Agar verlangten, konnte natürlich nur die erste Methode angewandt werden. Alle Keime kamen bei 37° zur Bebrütung. Nach 48 oder bei dichtem Wachstum und Neigung zum Konfluieren bereits nach 24 Stunden erfolgte das Auszählen mit bloßem Auge. Für Keime aus Oberflächenwasser schloß sich daran eine Prüfung auf Reinheit und eine Differenzierung in der bunten Reihe an.

Die Keime wurden in einer 10 Stoffwechselleistungen umfassenden bunten Reihe überprüft. Diese bestand aus:

- | | |
|------------------------------|---------------------|
| 1. Glukose | 6. Methylrot |
| 2. Laktose | 7. Voges-Proskauer |
| 3. Saccharose | 8. Citrat |
| 4. Mannit (44° im Wasserbad) | 9. Gelatine |
| 5. Indol | 10. Bleiazetatagar. |

Außerdem wurde das Wachstum auf Endo-Platten, die Beweglichkeit im hängenden Tropfen und das Grampräparat berücksichtigt.

Die erste Ablesung sowie die Feststellung der Indol- und H₂S-Bildung und der Gelatineverflüssigung erfolgte nach 48 Stunden; die Methylrot-, Voges-Proskauer — und Citratprobe wurde nach 5 Tagen ausgewertet. Bei unklaren Fällen von Laktosespaltung erfolgte nach 5 und 14 Tagen eine zweite und

dritte Ablesung. Der Beurteilung der einzelnen Arten und Unterarten innerhalb der Gruppe der Coliformen lag das Schema nach *Buttiaux*⁵ zugrunde.

Da die Art *E. coli*, Keime mit sowohl positiver als auch negativer Indol- und Bulirprobe umfaßt, werden bei den folgenden Arbeiten Coli-Keime mit positiver Indolprobe bei positiver (Coli I)²⁴ oder negativer (Typ Irreg. I) Bulirprobe als „fäkale“ Coli besonders hervorgehoben, die anderen wurden einfach als *E. coli* bezeichnet.

2. Gegenüberstellung von Endo-Agar und TTC-Agar 1:450

Zwei orientierende Vorversuche hatten gezeigt, daß eine Probe von Flußwasser unverdünnt auf TTC-Platten aufgetragen werden mußte, um wenigstens eine Ausbeute von einigen Kolonien zu erhalten. Auf Endo-Agar ergab die gleiche Probe auch unverdünnt noch gutes Wachstum, sodaß ein Keimzahlverhältnis von TTC : Endo wie 1 : 825 zustande kam.

Bei den folgenden 3 Hauptversuchen wurden je 10 TTC- und Endo-Platten* mit jeweils 0,5 ccm Oberflächenwasser oder einer Verdünnung davon beschickt. Die Hälfte von ihnen, also 5 TTC- und 5 Endo-Platten, erhielten einen Schichtguß, die übrigen wurden einfach ausgespatelt. Bei Versuch 1 und 2 kam die Probe unverdünnt auf TTC-Agar, während die Verdünnung für Endo 1 : 100 betrug; bei Versuch 3 erfuhr die für TTC-Agar bestimmte Probe eine Verdünnung von 1 : 10, die für Endo-Agar von 1 : 1000. Für diesen letzten Versuch war eine neue Nährbodencharge benutzt worden, die auf TTC-Agar ein besseres Wachstum hervorrief. Dadurch, daß vom Zeitpunkt der Probeentnahme bis zum Auftragen der Keime auf die beiden Substrate nicht mehr als 30 Minuten vergingen, sollte erreicht werden, daß der bakterielle Stoffwechselzustand so erhalten blieb, wie es seinem natürlichen Vorkommen entsprach.

Nach 48-stündiger Bebrütung bei 37° ergaben sich die in Tab. 1 aufgeführten, erheblich von den Endo-Werten abweichenden TTC- Keimzahlen.

Tabelle 1

Wachstum auf	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	TTC	Endo	TTC	Endo	TTC	Endo
Verdünnung:	unverdünnt 1 : 100		unverdünnt 1 : 100		1 : 10	1 : 1000
Durchschnittl. Kolonienzahl pro Platte:	7,7	361,2	0,8	66,7	10,2	12,2
Fuchsinglänzende Keimzahlverhältnis TTC: Endo	—	13,0 ‰	—	28,5 ‰	—	21,0 ‰
Verhältnis TTC: Fuchsinglänzende	1 : 2994,8		1 : 8362,5		1 : 119,6	
	1 : 389,6		1 : 2337,5		1 : 24,5	

* Verwendet wurden Petrischalen von 8,5 cm Durchmesser. Bei der geringen Kolonienzahl pro Platte (Tabelle 1) war eine gegenseitige Wachstumsbeeinflussung ausgeschlossen.

Tabelle 2

Keimarten:	Von TTC-Platten isoliert		Von Endo-Platten isoliert	
	Keimzahl	o/o	mit Fuchsinglanz	ohne Fuchsinglanz
<i>E. coli</i> + „Fäkal-coli“	6	3,2	10	—
<i>E. intermedium</i>	35	20,4	5	—
<i>E. freundii</i>	3	—	4	1
<i>A. aerogenes</i>	74	40,3	2	2
<i>A. cloacae</i>	1	—	—	—
<i>Paracolobactrum</i> *	39	21,0	5	7
<i>Paracoli</i> **	2	1,1	23	23
<i>Ps. fluoreszens</i>	4	2,2	—	2
<i>Ps. aeruginosa</i>	22	11,8	—	—
<i>Flavobacterium</i>	—	—	—	2
<i>Alcaligenes faec.</i>	—	—	—	6
<i>Achromobakter</i>	—	—	—	6
Insgesamt	186	100,0 o/o	50	50

* Keime mit Säure und Gasbildung aus Dextrose und verzögerter oder fehlender Gasbildung aus Lactose.

** Keime nur mit Säuerung von Dextrose und Lactose.

Die Keimzahlverhältnisse TTC : Endo liegen bei den aufgeführten 3 Versuchen zwischen 1 : 120 und 1 : 8 400. Die alleinige Berücksichtigung der fuchsinglänzenden Endo-Kolonien läßt das Verhältnis zwar um etwa das Fünffache besser werden, ändert aber nichts an der Tatsache des erheblich schlechteren Wachstums auf TTC-Agar.

Um wenigstens überschlägig eine Aussage über die bei diesem Verfahren auf TTC-Agar erfaßten bzw. nicht erfaßten Arten des Oberflächenwassers machen zu können, wurden sämtliche 186 TTC-Kolonien sowie 100 willkürlich gewählte Endo-Kolonien der Differenzierung unterworfen (Tabelle 2).

Es zeigt sich nun unter den vom TTC isolierten Keimen ein Dominieren der *Aerogenes* und *Intermedius*-Keime und ein ungewöhnlich häufiger Nachweis von *Ps. aeruginosa*. Die Coli-Zahl war sehr gering. Das Ergebnis der 50 bunten Reihen von fuchsinglänzenden Endo-Kolonien zeigt ein deutliches Überwiegen von *E. coli* einschließlich „Fäkal-Coli“ gegenüber *E. intermedium*, *A. aerogenes* und *Ps. aeruginosa*, die unter den 50 nicht fuchsinglänzenden Endo-Kolonien überhaupt nicht nachgewiesen wurde.

Es ließ sich daher vermuten, daß außer der generellen starken Keimzahl-abnahme auf TTC-Agar, die unter vorliegenden Versuchsbedingungen alle Arten — vielleicht mit Ausnahme von *Ps. aeruginosa* — zu umfassen scheint, die Art *E. coli* besonders stark gehemmt wird.

In Anbetracht des Mißverhältnisses der Keimzahlen zwischen TTC- und Endo-Platten (Tab. 1) erschien eine statistische Sicherung der Ergebnisse nicht notwendig.

3. Versuche mit Coli-Keimen frischen fäkalen Ursprungs.

Bei Verwendung einer Stuhlaufschwemmung anstelle von Oberflächenwasser lagen die Keimzahlen auf TTC und Endo ähnlich weit auseinander wie in den vorangehenden Versuchen und ergaben ein Verhältnis 1 : 1200. Auch hier zeigte sich bei der Differenzierung von Kolonien beider Nährböden, daß *E. coli* eine stärkere Hemmung als andere Keime der Coli-Aerogenes Gruppe erfährt.

4. Versuche mit Keimaufschwemmungen.

Um die Unterschiede in der Hemmwirkung innerhalb einzelner Arten einerseits, und im Verhältnis zu anderen Arten andererseits, in eine zahlenmäßige erfaßbare Form zu bringen, wurden eine Reihe von Stämmen, die vorher nochmals in der bunten Reihe überprüft worden waren, nach 18-stündigem Wachstum in Dextrose-Bouillon in vorher ausgetesteter Verdünnung auf TTC- und Endo-Platten gebracht, bebrütet und ihr jeweiliges

Tabelle 3

Stamm			Keimzahl pro Platte		% der TTC-Kolonien von Endo-Kolonien
			TTC	Endo	
R	31	<i>E. coli</i>	108	674	16,0
RT	14	<i>E. coli</i>	4	770	0,5
RT	24 a	<i>E. coli</i>	56	533	10,5
RT	27	<i>E. coli</i>	31	412	7,5
RT	34	<i>E. coli</i>	5	377	1,3
St	1	<i>E. coli</i>	6	320	1,9
St	2	<i>E. coli</i>	29	159	17,4
M	47	<i>E. intermed.</i>	—	160	0,0
RT	34 b	<i>E. intermed.</i>	214	216	99,0
MT	82	<i>E. intermed.</i>	384	429	89,6
St	3	<i>E. freundii</i>	160	228	70,1
MT	32	<i>E. freundii</i>	65	321	20,4
R	7	<i>E. freundii</i>	4	551	0,8
MT	53	<i>A. aerogenes</i>	268	289	92,9
RT	1	<i>A. aerogenes</i>	442	599	73,8
RT	42	<i>A. aerogenes</i>	35	311	11,2
RT	20	<i>Ps. aeruginosa</i>	264	300	88,0
RT	39	<i>Ps. aeruginosa</i>	219	250	87,6
RT	59	<i>Ps. aeruginosa</i>	213	220	96,8
MT	13	<i>Ps. fluoreszens</i>	147	164	89,6
RT	13	<i>Ps. fluoreszens</i>	104	124	83,9
RT	12	<i>Paracolibaktr.</i>	200	354	56,6
MT	10	<i>Paracolibaktr.</i>	309	338	91,4
MT	20	<i>Paracolibaktr.</i>	279	300	92,8
MT	57	<i>Paracoli</i>	109	248	43,8

prozentuales Verhältnis der auf TTC gewachsenen Kolonien gegenüber Endo errechnet. Die Ergebnisse stellten Mittelwerte aus jeweils 5 Platten dar. Die festgestellten Keimzahlen bestätigen erneut das Vorliegen einer einwandfrei stärkeren Empfindlichkeit von *E. coli* auf TTC-Agar gegenüber anderen Keimen der Coli-Aerogenes-Gruppe sowie gegenüber *Ps. aeruginosa* (Tab. 3).

Man kann auf Grund dieser Ereignisse sagen, daß auf TTC-Platten im Prinzip fast alle der hier getesteten Stämme bzw. Arten zu wachsen vermögen; sie werden jedoch je nach Art und Stamm verschieden stark gehemmt. Am wenigsten ausgeprägt ist diese Hemmung bei *Ps. aeruginosa*, am deutlichsten bei *E. coli*. Dies ist offenbar der Grund für den relativ häufigen Nachweis von *Ps. aeruginosa* auf TTC-Medien und für die im Verhältnis seltener Erfassung anderer Arten, besonders von *E. coli* aus Wasserproben.

Das innerhalb einer Art auftretende unterschiedliche Wachstum auf TTC-Agar ist mit individuellen Schwankungen einzelner Stämme, wie sie auch bei den späteren Untersuchungen über die pH-Empfindlichkeit von Coli-Stämmen bei TTC zutage tritt, zu erklären.

5. Konstanz biochemischer Leistungen nach TTC-Passage.

Klein hatte bereits die Frage angeschnitten, ob die unzulänglichen Colizahlen auf TTC-Agar nicht eventuell durch eine Änderung biochemischer Leistungen vorgetäuscht werden könnten, welche die Keime nach der in der Praxis in Frage kommenden einmaligen TTC-Exposition erleiden.

Eigene Untersuchungen mit 43 von Endo-Platten isolierten Stämmen ergaben keine Veränderung ihrer vor und nach einer TTC-Passage angesetzten Proben auf Vergärung von Glukose, Laktose, Saccharose und der IMViC-Reihe, bei der Gelantineverflüssigung, der H_2S -Bildung und beim Ausfall der Bulirschens Probe. Die Prüfung geschah mit 19 *E. coli*, 4 *E. intermedium*, 5 *E. freundii*, 3 *A. aerogenes*, 4 *Paracolibacterium*, 3 *Paracoli*, 2 *Ps. fluoreszens*, 2 *Flavobacterium*-Stämmen und 1 *Alcaligenes faecalis*-Stamm.

Wie sich eine fortgesetzte Überprüfung auf TTC-haltige Nährmedien auswirkt, wird noch überprüft.

6. Über den Nachweis der Keimhemmung durch TTC und ihre Beseitigung

a) Der Nachweis der Stoffwechselstörung durch TTC.

Die bei vorstehenden Versuchen auf TTC-Platten gelangende und sich nicht zu einer Kolonie entwickelnden Keime werden nach kurzer Zeit so geschädigt, daß sie durch Übertragen auf einen nicht hemmenden Nährboden nicht mehr zum Wachstum zu bringen sind.

Dieser Nachweis gelingt unter Verwendung der Membranfiltermethode. Dabei wurden die in Peptonwasser verdünnten Keime einer 8-stündigen Bouillonkultur eines TTC-empfindlichen Stammes — jenes Stammes, welcher bei den Versuchen mit Keimaufschwemmungen nur 0,5 % der Endo-Keimzahlen auf TTC-Agar erreichte — in 5.0 cem Peptonwasser durch das Filter gesaugt, sodaß etwa 200 Kolonien gleichmäßig darauf verteilt waren. Die unter sterilen Kautelen in 6 gleiche Sektoren zerteilten Filterscheiben wurden sofort auf vorgewärmte TTC-Agarplatten aufgelegt, in Abständen wieder abgenommen und auf einen 3 %igen Laktose-Agar sowie auf einen 3 %igen Laktose-Agar mit 20 % Milchzusatz übertragen und 48 Stunden bebrütet (Tabelle 4). Alle Gerätschaften und Platten besaßen eine Temperatur von 37°. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Agars, auf den die Membranfiltersektoren nach der TTC-Exposition gebracht wurden, zeigte sich eine verschieden rasche Unterdrückung des Coli-wachstums, so daß das eine Mal nach 4 dann nach 3 Stunden kein Keim-nachweis mehr gelang.

Tabelle 4

Dauer der TTC-Einwirkung	Zahl der Kolonien auf Agar Milchagar	
0 Minuten	58	74 Kolonien
30 Minuten	41	70 Kolonien
1 Stunde	25	79 Kolonien
2 Stunden	5	16 Kolonien
3 Stunden	0	1 Kolonien
4 Stunden	0	0 Kolonien
5 Stunden	0	0 Kolonien
6 Stunden	0	0 Kolonien

b) Milch und Serumzusatz zum Agar.

Zunächst wurde versucht, durch Zusatz eiweißhaltiger Substanzen zu TTC-Agar die hemmende Wirkung des Tetrazols abzuschwächen. Dies war durch größere Mengen sterilisierter Milch zu erreichen, und zwar stiegen beginnend bei 5 % Milchgehalt die Keimzahlen mit steigender Milchkonzentration linear an. Sie erreichten bei 20 % Milchzusatz 25 % der tatsächlichen auf Endo-Kontrollplatten nachgewiesenen Keimzahlen.

Die Wirkung schien jedoch nicht, wie leicht anzunehmen wäre, auf einer entgiftenden Funktion des Milcheiweißes zu beruhen, denn bei Verwendung von Rinderserum anstelle von Milch trat die bakteriostatische Wirkung des TTC in vollem Umfange auf. Das Serum selbst besaß im Leerversuch keine nennenswerte keimhemmende Wirkung.

c) Anfachen der Stoffwechselaktivität durch vorheriges Bebrüten der Keime.

Der Versuch, den physiologischen Zustand der Keime zu ändern, hatte bessere Ergebnisse. Ausgehend von der Vorstellung, daß die Zahl der sich unter TTC-Einfluß zu Kolonien entwickelnden Keime dann größer

werden müßte, wenn ihr Stoffwechsel vor der Einwirkung von TTC durch die Nährstoffe des Nährbodens bereits angefaßt worden ist, wurden Keime einer 18-Std.-Dextrose-Bouillon-Kultur in 15 ccm Nähragar von 50° suspendiert, zu Platten gegossen und bei 37° bebrütet. Von Zeit zu Zeit wurden je 2 Platten mit der für die Konzentration 1:450 errechneten Menge einer 2%igen wässrigen TTC-Lösung überschichtet und mit geöffnetem Deckel bis zum Verschwinden der überstehenden Flüssigkeit bei 37° getrocknet. Wie in Diffusionsversuchen mit Agarsäulen geprüft werden konnte, erfolgte die Verteilung des Tetrazols relativ rasch. Nach halbstündigem „Anbrüten“ der Keime war bereits ein Ansteigen der Kolonienzahl zu beobachten. Nach 2 Stunden war der Wert der TTC-freien Kontrollen erreicht (Tabelle 5).

Tabelle 5

Dauer der Anbrütung	0	10	25	45	60	75	90	120 Min.
Keimzahl nach TTC-Überschichtung	110	122	160	224,5	281	302,5	346	391,5

Endo: 406; Nähragar: 402

Damit ergibt sich eine Möglichkeit, stoffwechsel-schwache, TTC-empfindliche Keime wieder so weit „aufzufüttern“, daß sie die zellschädigenden Einflüsse des invertseifenähnlichen TTC ohne weiteres ertragen können.

Keime, die gegenüber TTC sehr empfindlich sind, wie z. B. der größte Teil der Paracoli, lassen ein solches Verhalten jedoch vermissen. Selbst nach 3-stündiger Anbrütung vermochte sich bei einem geprüften Stamm trotz maßiver Einsaat keine einzige Kolonie nach TTC-Zusatz zu entwickeln.

Auch bei Verwendung von Oberflächenwasser anstelle einer Coliaufschwemmung läßt sich ein gleiches Verhalten feststellen. Nach 30-minütiger Anbrütung beginnen auch hier die Keimzahlen der TTC-Platten zu steigen, um nach 3-stündiger Anbrütung etwa die gleichen Werte wie die fuchsin-glänzenden Kolonien der Endo-Kontrollplatten zu erreichen.

Wegen des langwierigen Eintrocknungsprozesses eignet sich das Verfahren aber höchstens für keimtragende Membranfilterscheiben, die ohne Schwierigkeiten zuerst für 3 Stunden auf einen optimalen Nährboden und anschließend auf eine TTC-Platte aufgebracht werden können. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, daß unter Beibehaltung der TTC-Konzentration 1:450 einerseits alle, auch die durch längeren Aufenthalt in nährstoffarmen, kühleren Wassern in ihrem Stoffwechsel darniederliegenden Coli-Keime herausgezüchtet werden können und andererseits die Selektivität gegenüber störenden Keimen kaum verändert wird.

Zusammenfassung

1. Der Nachweis von Wasserkeimen auf einem in üblicher Weise hergestellten TTC-Agar 1 : 450, ist mangelhaft. Es tritt eine starke Keimzahlverminderung gegenüber dem Kontrollmedium ein, wobei *E. coli* stärker gehemmt wird, wie z. B. *A. aerogenes*, *E. intermedium* und *Ps. aeruginosa*.
2. Die auf einem solchen Nährboden der Einwirkung von TTC ausgesetzten Coli-Keime sind bereits nach 4 Stunden auf einem indifferenten Nährboden nicht mehr vermehrungsfähig.
3. Zusatz von 20 % Milch zu dem TTC-Agar vermag die Coli-Zahlen einer Coli-Aufschwemmung etwas anzuheben.
4. Die Abhängigkeit der TTC-Wirkung von der Stoffwechsellage der Aussaatkeime ergibt sich daraus, daß ein vorheriges Anbrüten der Keime und nachfolgender TTC-Zusatz ebenso die Koloniezahlen erhöht, wie die Übertragung von angebrüteten Membranfilterscheiben auf den TTC-haltigen Nährboden. Dabei bleibt die Selektivität für *E. coli* weitgehend erhalten.
5. Ohne diese Verbesserungen unter 4.) erwies sich der TTC-Nährboden nach 1.) im Ganzen gesehen, als unbrauchbar für den Nachweis von Wassercoli.

Summary

The detection of *E. coli* occurring in the water by means of an agar medium containing TTC (1 : 450) and prepared in the usual manner is insufficient. Higher *E. coli* counts have been obtained on an agar medium containing TTC and enriched with milk. All bacteria inoculated are demonstrable after incubation of the bacteria on a TTC free medium for 4 hrs. followed by addition of TTC or by transfer of the inoculated and incubated membrane filter discs onto agar containing TTC.

Résumé

On ne trouve que peu de colibacilles d'eau sur un TTC-Agar 1 : 450 normalement composé. En ajoutant du lait à l'agar on en trouve davantage. Après incubation de 4 heures des germes sur un milieu sans TTC et après avoir ajouté du TTC ou en transportant des lamelles de filtre en membrane incubées sur l'agar TTC on peut trouver tous les germes de coli-bacilles semés.

Schrifttum

1. Die Amerikanischen Einheitsverfahren zur Untersuchung von Wasser und Abwasser; Deutsch von F. Sierp, München 1951, S. 246 — 2. Bielig, H. J., G. A. Kausche u. H. Haardick, Zschr. Naturforsch. 4b (1949): 80 — 3 Borneff, J. u. B. Frobel, Arch. Hyg. 141: 241 — 4 Brodie, A. F. u. J. S. Gots, Science 116 (1952): 40 (zit. nach Laudemann) — 5 Buttiaux, R. L'analyse bactériologique des eaux de consommation. 1. Aufl., Paris 1951, S. 54—65 — 6 Gargani, G. u. G. Marraccini, Nuovi ann. igiene mikrobiol. 5 (1954): 209 — 7 Harms, F. u. K. H. Wegener, Arch. Lebensmittelhyg. 6 (1954): 107 — 8 Jerchel, D. u. W. Möhle, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 77 (1944): 591 — 9 Klein, H., Berliner Münchener tierärztl. Wschr. 68 (1955): 58, 133, 143 u. 214 — 10 Knorr, M., Arch. Hyg. 136 (1952): 240 — 11 Kopper, F. H., J. Bact. 63 (1952): 641 — 12 Kuhn, R. u. D. Jerchel, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 74 (1941): 941 — 13 Lettre, H., T. Krebsforsch. 57 (1950): 1 — 14 zitiert nach: Mager-Arendt, J., Klin. Wschr. 27 (1949): 608 — 15 Rauch, G., Arch. Hyg. 128 (1944): 63 — 16 Schönberg, F., (1) Lebensmittel-tierarzt 2 (1951): 52 — 17 ders. (2), ebda. 4 (1953): 137 — 18 ders. (3), ebda. 4 (1953): 176 — 19 ders., (4), ebda. 4 (1953): 284 — 20 ders., (5), ebda. 5 (1954): 103 — 21 ders. (6), Arch. Hyg. 138 (1954): 583 — 22 Seelermann, M. u. K. H. Wegener, Milchwissenschaft 11 (1956): 51 — 23 Wundt, W., Dtsch. Med. Wschr. 75 (1950): 1471 — 24 Wilson, G. S. et al., The Bact. Garding of Milk, London 1935

Aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut der Universität Erlangen
(Vorstand: Prof. Dr. M. Knorr)

Über die Ursachen des Versagens von TTC-Nährböden in der Wasserbakteriologie nebst Vorschlägen zu ihrer Beseitigung

Von F. Selenka

Mit 5 Abbildungen

Einleitung

In der Literatur wird von Faktoren berichtet, die in der Lage sind, die Reduktion von TTC zu Formazan zu fördern oder zu hemmen. Eine genaue Untersuchung dieser Frage steckt allerdings auch heute noch in den Anfängen. *Jambor*⁵ betont z. B. ausdrücklich, daß trotz umfangreicher biologischer Anwendung des TTC wenig über den Mechanismus der Reduktion und den Einfluß der verschiedenen Versuchsbedingungen auf diesen bekannt ist. Auch *Lindenmann*⁹ führt die Lösung von Fragen, wie der Pufferung, der Anwesenheit von Elektrolyten und der Sauerstoffspannung als noch offenstehende Probleme an. Nach den bisher gewonnenen Erfahrungen kommt folgenden Faktoren eine besondere Bedeutung zu:

1. Die Wasserstoffionenkonzentration. *Bielig*, *Kausche* und *Haardick*¹ fanden in einer Bouillonkultur von *E. coli* bis pH 4,6 praktisch keine Formazanbildung. Von hier steigt die Kurve aber steil bis zu ihrem Maximum bei pH 8,4 an, um im stärker alkalischen Bereich, in dem die Eigenreduktion bereits wirksam zu werden beginnt, wieder abzufallen. Auch *Wundt*²¹ gibt als pH-Optimum 8—9 an, während *Schönberg*¹¹ mit pH 7,5 bis 8,0 zu etwas niedrigeren Werten kommt. Bei *Lindenmann* liegt die untere Grenze der Formazanbildung im phosphatgepufferten Medium bei pH 5,5, bei *Kopper*⁸ noch unter pH 5,0. *Jambor* weist ferner darauf hin, daß unter pH 6,0 die kolorimetrische Bestimmung der umgesetzten TTC-Menge durch Bildung eines farblosen Reduktionsproduktes fehlerhaft wird.

2. Die Anwesenheit und Konzentration von Elektrolyten. *Lindenmann* konnte zeigen, daß *E. coli* in einem M/10 Veronalpuffer erst bei höheren pH-Werten die gleiche Menge Formazan entstehen läßt, als in einem M/10 Phosphatpuffer. Nach *Kopper* reduzierten *Coli*-Keime in NaCl-Lösungen in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration und dem Alter der Keime in unterschiedlicher Stärke. Alte Keime (18-Std.-Agarkultur) ergeben bei 1‰ NaCl die besten Resultate, während sie bei 0‰ kein Formazan und bei 5‰ nur Spuren bilden. Junge Zellen (4-Std.-Kulturen) besitzen bei 0‰ NaCl ihr Reduktionsoptimum, welches bereits bei 1‰ stark abgesun-

ken ist und bei 2% nur noch Spuren erkennen läßt. Eine gleiche Wirkung wurde mit anderen Salzen, sowie mit einem Phosphatpuffer erzielt.

3. Das Alter der Keime. Das Alter oder besser die Stoffwechselaktivität der Keime spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle. Junge Keime unterscheiden sich in ihrem starken Reduktionsvermögen erheblich von älteren Keimen, wie dies für die Nitratreduktion von *Knorr* und *Borneff*⁷ mit nativen Stuhlkeimen und verschiedenen alten Kulturkeimen bereits gezeigt wurde. *Kopper** führt das nachlassende Reduktionsvermögen älterer Keime auf eine Änderung ihrer Permeabilitätsverhältnisse zurück, während *Bielig*, *K.* u. *H.*, vor allem Nährstoffmangel und Anhäufung hemmender Stoffwechselprodukte dafür verantwortlich machen. Bei 6—10-stündigen Bouillonkulturen von *E. coli* finden sie nach kurzer TTC-Einwirkung nur etwa 5% der Keime ohne Formazan-Aufnahme, während es bei 24-stündigen 50% sind. Ein ähnliches Unvermögen älterer Colikeime, TTC zu reduzieren, findet *Stolp*¹⁹ auf Agarplatten. Durch Übergießen mit einer 1%igen Glucoselösung kann dieses Unvermögen wieder beseitigt werden. Auch *Narahara*¹⁰ beobachtet bei alten gewaschenen *Coli*-Keimen keine Formazanbildung.

4. Die Anwesenheit von Wirkstoffen. *Shreenivasamurthy*¹⁸ beschreibt einen Stamm von *Strept. faecalis*, der nur bei Gegenwart von Riboflavin TTC in Formazan umwandeln kann*. In enger Beziehung dazu steht die Feststellung *Wallhäusers*²⁰, daß bestimmte, von Pilzen ausgeschiedene Stoffe die Altersgrenze des TTC-Reduktionsvermögens wesentlich nach oben verschieben können.

5. Die Sauerstoffspannung im Reaktionsgemisch. Ihr Einfluß ist noch wenig bekannt. *Lindenmann* deutet einen eigenartigen Kurvenverlauf bei der Reduktion sehr kleiner Mengen von TTC (Vorliegen eines Wendepunktes) mit einer konkurrierenden Wirkung des Sauerstoffes. Auch *Bielig*, *K.* u. *H.* vermuten Zusammenhänge zwischen O₂-Gehalt und dem zeitlichen Ausmaß der Formazanbildung.

6. Die Einwirkung von Licht, bes. von UV-Strahlung. Sowohl bei direkter Sonneneinstrahlung, als auch unter der UV-Lampe beobachtet *Schönberg*¹¹ ein rascheres Ablaufen der Reduktion in Bouillonaufschwemmungen als im diffusen Tageslicht oder gar in absoluter Dunkelheit. Quantitative Angaben über diese Reduktionsabläufe finden sich bei *Jambor*⁵, der mit einer Ascorbinsäurelösung und einer Hefeaufschwemmung bei verschiedenen pH-Werten sowohl bei Licht, als auch bei Dunkelheit arbeitet.

7. Der bakterizide Effekt des TTC. Es sollte nicht unbeachtet bleiben, daß durch diesen Effekt des TTC ein Teil der Keime nach der Aussaat bei längerer Bebrütung — oder allgemein bei länger dauernden Versuchen — abstirbt, und daß dadurch die quantitative Auswertbarkeit von gewachsenen Kolonien auf TTC-Agar oder von extrahierbarem Formazan bei Stoffwechseluntersuchungen erheblich leiden kann.

Dementsprechende Untersuchungen finden sich in der bereits mehrfach zitierten Arbeit von *Bielig*, *K.* u. *H.*, welche unter anderem die pH-Abhängigkeit dieser Bakterizidie feststellt. Bei pH 4,6 bei dem kein Formazan gebildet wird, ist auch kein Absinken der Keimzahl festzustellen, während bei dem Maximum der Reduktion bei pH 8,4 etwa 50% der Keime nach 20stündiger TTC-Einwirkung abgetötet werden. Die nahe Verwandtschaft des TTC mit Invertseifen erklärt diesen keimschädigenden Effekt in hinreichendem Maße. Über eigene Versuche, die mit Hilfe der Membranfiltermethode ein Absinken der Keimzahlen bei zunehmender Dauer der TTC-Exposition zeigen, wurde bereits berichtet¹⁷.

* Nach Drucklegung wurde eine weitere Arbeit von *Laxminarayana*, *Shreenivasamurthy* und *Iya*²² über den Einfluß von Substanzen des Vit. B-Komplexes (auch von pH und Art des verwandten Peptons) auf die TTC-Reduktion bekannt.

8. Das Vorhandensein von Fermentgiften (Schwermetalle) im Reaktionsgemisch. Bei alten gewaschenen Coli-Keimen war bei Versuchen von *Kopper* und *Lindenmann* eine bestimmte kritische Keimdichte nötig, um eine rasche endogene Reduktion entstehen zu lassen. Nach *Lindenmann* kann daher vermutet werden, daß das Reaktionsgemisch Spuren von Fermentgiften (Schwermetalle) enthält, die eine bestimmte Anzahl von reduzierenden Bakterien blockieren können.

9. Allgemeine Versuchsbedingungen. Daß die Menge des gebildeten Formazans natürlich auch von Keimart, Konzentration des TTC, Einwirkungstemperatur, Einwirkungszeit und der zur Reaktion verwandten Keimmenge abhängig ist, braucht nicht ausdrücklich betont zu werden. Die für die beiden letzten Faktoren bestehenden linearen Beziehungen werden durch Meßergebnisse bei *Bielig*, K. u. H., *Kopper*, *Lindenmann* und *Güllissen* u. *Bechert*³ wiedergegeben.

A. Die Bedeutung der Wasserstoffionen- und Salzkonzentration für die Größe der auf TTC-Agar nachgewiesenen Colizahlen

Die in der vorausgegangenen Arbeit¹⁷ festgestellten niedrigen Coli-Zahlen aus Wasserproben, wie sie auf TTC-Agar erzielt wurden, waren Anlaß den Ursachen dieser Verminderung nachzugehen, da verschiedene Autoren^{4, 6, 12—17, 16} mit Hilfe des gleichen Verfahrens brauchbare und völlig mit Vergleichsmedien übereinstimmende Colizahlen in Milch und Keimaufschwemmungen erhielten. Zwar war bereits durch Hinzufügen von Milch zu einem TTC-haltigen Medium oder durch vorheriges Anbrüten der Keime in TTC-freien Medien ein mehr oder weniger starker Anstieg der Colizahl festzustellen, das vorherrschende hohe Keimzahldefizit auf TTC-Platten konnte aber erst in befriedigender Weise herabgesetzt bzw. ganz aufgehoben werden, als bei systematischen Untersuchungen der Nährbodenzusammensetzung die enge Beziehung zwischen Wasserstoffionenkonzentration und der Zahl der sich zu Kolonien entwickelnden Keime hervortrat.

Die Methodik blieb gegenüber der früheren Arbeit unverändert. In späteren Versuchen wurde ein Agar verwandt, der ohne K_2HPO_4 - und NaCl-Zusatz hergestellt worden war und der vor dem Autoklavieren auf pH 7,2 eingestellt wurde. Erforderliche Kochsalzzusätze wurden durch Zugabe von NaCl in Substanz zusammen mit dem Laktosezusatz vorgenommen.

1. pH-Wert und Coli-Zahl

Der bei unseren Versuchen (Abschnitt C 4) der vorausgegangenen Arbeit¹⁷ benutzte Coli-Stamm R 31 (4-Std.-Kultur) ergab bei pH 7,0 ein ganz geringes Wachstum, das erst im leicht sauren Bereich bei pH 6,4 stärker wurde und bei pH 6,0 plötzlich die Werte der Endo-Kontrollen erreichte. Bei noch geringeren pH- Werten sanken die TTC-Keimzahlen wieder ab. Keime einer 18-stündigen Bouillonkultur erreichten ebenfalls die Endo-Keimzahlen bei pH 6,0, fielen aber sowohl im mehr alkalischen, als auch im mehr sauren Bereich stärker, als Keime einer lebhaft wach-

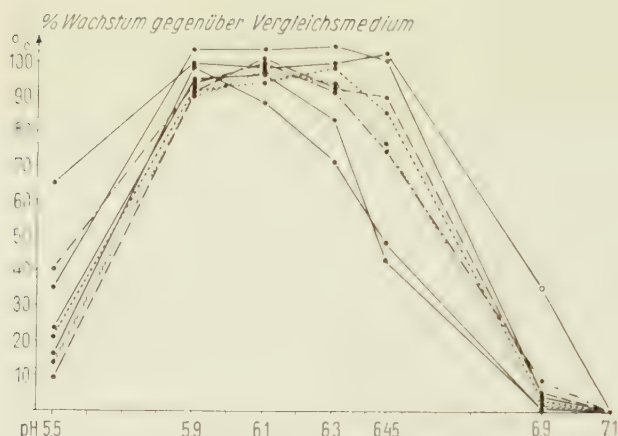


Abb. 1. pH-Abhängigkeit des TTC-Wachstums. 3%iger Fleischextraktagar, phosphatgepuffert, im Alkalischen autoklaviert, 0,5% Laktose, TTC 1:450. pH-Einstellung mit 10%iger HCl und Kontrollmessung mit Oberflächenglaselektrode. Vergleichsmedium: Nähragar. 8 Stämme von *E. coli*, 4-stdg. Dextrose-Bouillon-Kulturen. Aussaat pro Platte: ca. 200 Keime.

senden 4-Std.-Kultur gegenüber dem Endo-Vergleichswert ab. Das Verhalten von 8 frisch aus Fäzes isolierten *Coli*-Stämmen, die nach 4-stündiger Bebrütung in Dextrose-Bouillon auf TTC-Agar von verschiedenem pH gebracht worden waren, zeigt, daß bei pH 6,1 ein Optimum des Wachstums zu erreichen ist. Bemerkenswert erscheint das Vorhandensein von Stämmen, die sich gegenüber dem Gros durch sehr geringe Keimzahlen knapp unterhalb des Neutralpunktes auszeichnen (Abb. 1).

2. Salzkonzentration und *Coli*-Zahl

Ein weiterer keimzahlbestimmender Faktor ist in der Salzkonzentration des Nährmediums zu suchen. Eigene Versuche zeigen analog den Arbeiten von Kopper eine Beziehung zwischen NaCl-Konzentration, Keimalter und Zahl der jeweils unter Reduktion des TTC sich zur Kolonie entwickelnden Keime. Es liegt das Optimum bei dem hierzu verwandten phosphatgepufferten TTC-Agar 1:450 von pH 6,8 sowohl bei jungen Keimen einer 8-Std.-Kultur, als auch bei alten einer 18-Std.-Kultur im Bereich der NaCl-Konzentrationen 1,0–1,5%. Die mit alten Zellen gewonnenen Keimzahlen lassen jedoch einen in niedrigeren und höheren NaCl-Konzentrationen steileren Abfall als junge Zellen erkennen; sie liegen auch im ganzen niedriger (Tab. 1).

3. Überlegenheit eines ungepufferten, sauren Agars ohne NaCl-Zusatz

a) 4-stündige *Coli*-Kulturen. Zur Ausdehnung der Untersuchungen auf salzärmere Medien war die Herstellung eines Agars nötig, der weder NaCl- noch Phosphatzusätze erhielt. Auf ihm nahmen die

Tabelle 1

Keimzahlen auf TTC-Agar 1 : 450, phosphatgepuffert, alkalisch autoklaviert, pH 6,8.

Vergleichsmedium Nähragar, 8- bzw. 18-Std.-Kultur von *E. coli* (Stamm R 31) in Dextrose-Bouillon.

Nähragar	8-Std.-Kultur		18-Std.-Kultur	
	Keimzahl/Platte 753 *	$\frac{\text{‰}}{100}$	Keimzahl/Platte 406 *	$\frac{\text{‰}}{100}$
TTC-Agar mit				
+ 0,5 ‰ NaCl	175	23,2 ‰	63	15,5 ‰
+ 1,0 ‰ NaCl	569	75,6 ‰	202	49,8 ‰
+ 1,5 ‰ NaCl	567	75,3 ‰	232	57,1 ‰
+ 2,5 ‰ NaCl	505	67,1 ‰	137	33,7 ‰
+ 3,5 ‰ NaCl	83	11,0 ‰	7	1,7 ‰
+ 5,5 ‰ NaCl	0	—,—	0	—,—

*) Mittelwert aus 5 Platten.

Keimzahlen oberhalb pH 6,1, also dort, wo bei phosphatgepuffertem Agar ein ungünstiges Wachstum stattgefunden hatte, deutlich zu.

Bei nachträglichem Zusatz von NaCl blieben seine Werte stets auch über denjenigen der entsprechenden Salzkonzentrationen des phosphatgepufferten Mediums (Abb. 2). Hier läßt im neutralen Bereich ein NaCl-Zusatz von 1—2 ‰ zu einem solchen phosphatfreien Agar nahe bei 100 ‰ liegende Keimzahlen entstehen, während bei darunterliegenden NaCl-Konzentrationen geringere Werte beobachtet werden. Bei 0 ‰ NaCl-Zusatz erreichen die Keimzahlen nur 8 ‰ der Werte des Vergleichsmediums. Gegen den leicht sauren Bereich hin verwischen sich diese Unterschiede zunehmend, so daß bei pH 6,1 bei allen Salzkonzentrationen und auf beiden Nährböden die gleichen, mit TTC-freien Kontrollplatten übereinstimmenden Resultate festzustellen sind. Diese Beobachtungen ließen sich mit 3 verschiedenen Stämmen stets in der gleichen Weise treffen.

b) 18-stündige Coli-Kulturen. Alte Keime einer 18-stündigen Bouillon-Kultur zeigten ein prinzipiell gleiches Verhalten. Auch hier lagen bei pH 6,1 die Werte aller Salzkonzentrationen und beider Agarmedien eng beieinander und deckten sich mit den Keimzahlen der TTC-freien Agarplatten. Ein Unterschied ergab sich erst im neutralen Bereich, wo mit steigendem NaCl-Gehalt nur zögernde Keimzahlzunahme erfolgte, der in Abb. 2 dargestellte fächerförmige Kurvenverlauf der NaCl-Konzentrationen 0—2 ‰ also erheblich in Richtung niederer Werte eingengt wurde. Bei pH 7,1 und 1 ‰ NaCl-Gehalt der TTC-Platten waren so nur 31 ‰ der 18-stündigen Kultur gegenüber 93 ‰ bei einer 4-stündigen Kultur nachweisbar. Keime außerhalb der logarithmischen Wachstumsphase zeigen also im neutralen Bereich gegenüber jungen, lebhaft wachsenden ein geringeres Wachstumsvermögen.

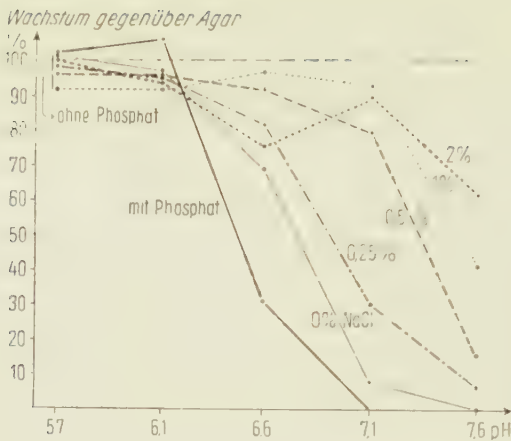
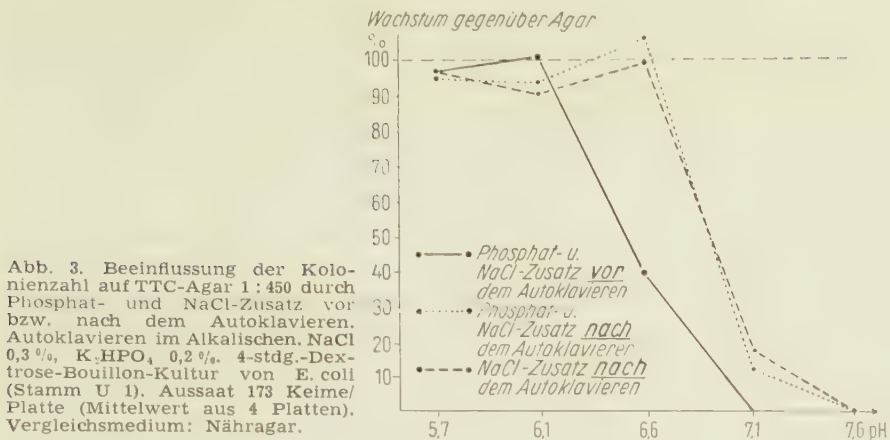


Abb. 2. Wachstum einer 4-stgd. Dextrose-Bouillon-Kultur von *E. coli* (Stamm U 1) auf TTC-Agar: a) ohne Phosphat- u. NaCl-Zusatz, neutral autoklaviert, mit nachträglichen Kochsalzzusätzen 0,25—2 ‰; b) mit Phosphat- u. NaCl-Zusatz, alkalisch autoklaviert. pH-Kontrolle der Platten mit Oberflächen-gläselektrode. Keimaussaat 557 Keime/Platte (Mittel aus 5 Platten).

c) Aufbewahren der Keime in sterilisiertem Oberflächenwasser bei $+8^{\circ}$. Ohne Zweifel unterscheidet sich der Stoffwechselzustand natürlich vorkommender Wasserkeime erheblich von dem der hier angewandten Keimaufschwemmungen. Um solchen, in Bezug auf die Aussagekraft so gewonnener Ergebnisse berechtigten Einwänden von vorneherein entgegenzutreten, wurde eine Anordnung in den Untersuchungsgang eingeführt, welche den natürlichen Bedingungen weitgehend gerecht wird. Bei ihr wurden Brühekulturen in sterilem Oberflächenwasser verdünnt (etwa 600—1000 Keime/ml) und bei $+8^{\circ}$ im Kühlschrank aufbewahrt. Eine Durchlüftung erfolgte durch täglich zweimaliges kräftiges Schütteln.

Nach 24-stündiger Aufbewahrungszeit ist bei jungen Coli-Keimen einer 4-stündigen Ausgangskultur eine deutliche Keimzahlabnahme auf TTC-Platten im neutralen Bereich festzustellen, welche besonders die höheren Salzkonzentrationen betrifft. Die höchste Keimzahl wird hier bei pH 7,1 in der NaCl-Konzentration 0,25 ‰ mit 30,6 ‰ angegangener Kolonien gegenüber dem Vergleichsmedium erreicht, während bei 2 ‰ NaCl-Gehalt nur 8,7 ‰ der Endo-Kolonien erscheinen. Ältere Keime zeigen den gleichen, nur bei etwas niedrigeren Keimzahlen liegenden Kurvenverlauf. Bei pH 6,1 behalten aber nach wie vor auch hier die Keimzahlen alter und junger Keime in allen Salzkonzentrationen ihren optimalen Wert bei.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß Keime aus einer 4-stündigen Bouillon-Kultur bei höheren NaCl-Konzentrationen im neutralen Bereich nahe bei den Werten des Vergleichsmediums liegende Keimzahlen ergeben. Die entsprechenden Zahlen der 18-Stunden-Kultur liegen dabei tiefer. Wurden diese Keime jedoch 24 Stunden bei $+8^{\circ}$ in sterilem Oberflächenwasser aufbewahrt, so zeigen sie eine zunehmende Empfindlichkeit gegen höhere NaCl-



Konzentrationen im neutralen Bereich, wobei auch hier wieder die Werte der 18-Stunden-Kultur etwas niedriger sind. In allen Fällen ist jedoch bei pH 6,1 volle Übereinstimmung mit dem Vergleichsmedium vorhanden.

4. Ursachen der Überlegenheit eines Agars von pH 6,1 ohne Phosphat und NaCl-Zusatz

a) Phosphatkomponente. Bei den eben zitierten Versuchen lief in der Regel eine Nährbodencharge des früher benutzten phosphatgepufferten Agars mit und ergab durchwegs niedrigere Keimzahlen. Ursächlich sind für dieses Verhalten entweder eine ungünstige Beeinflussung der Zellen durch Anwesenheit größerer Mengen von Phosphat-Ionen oder ein durch diese bedingtes stärkeres Ausfallen wichtiger bivalenter Ionen in Erwägung zu ziehen. Die erstere, an sich unwahrscheinliche Annahme konnte durch einen Versuch ausgeschlossen werden, bei welchem die Phosphat- und NaCl-Zusätze vor und nach dem Autoklavieren des Agars vorgenommen wurden. Dabei zeigte sich, daß der nachträglich mit 0,3 % NaCl und 0,2 K_2HPO_4 versehene Agar bei verschiedenen pH-Werten die gleichen Wachstumsmöglichkeiten bot, wie derselbe Agar ohne K_2HPO_4 . Eine direkte Hemmwirkung durch anwesende Phosphationen ist somit nicht gegeben. Der vor dem Autoklavieren mit 0,3 % NaCl und 0,2 % K_2HPO_4 versetzte Agar blieb demgegenüber entschieden zurück und lag mit seinen Keimzahlen bei sehr niedrigen Werten (Abb. 3).

Die Keimzahlverminderung, wie sie uns auf dem üblicherweise phosphatgepufferten Agar entgegentritt, ist daher in erster Linie auf Veränderungen zurückzuführen, die sich in ihm während des Autoklavierens abspielen.

Es ist bekannt, daß beim Erhitzen der Nährbodengrunds substrate wechselnde Mengen ausfallender Substanzen entstehen, die in der Hauptsache aus Erdalkaliphosphaten und -carbonaten zusammengesetzt sind. Da nun besonders dem Magnesium-Ion² eine wichtige Rolle als dehydrasenaktivierende Substanz zukommt und das System der Dehydrasen die Reduktion des TTC zu Formazan durchführt, ist eine ursächliche Verbindung zwischen Abnahme aktivierender Ionen, verringerter Dehydrasenaktivität, vermehrter Bakterizidie und damit geringerer Kolonienzahl anzunehmen. Bei Mangel an aktivierenden Ionen scheinen besonders ältere, in ihrem Stoffwechsel darniederliegende Keime nicht in der Lage zu sein, das in sie hineindiffundierende (s. Bielig, K. u. H.), vitalitätsschädigende Tetrazoliumsals durch Reduktion unwirksam zu machen.

Durch direkten Ionenzusatz nach dem Autoklavieren konnte das Vorliegen solcher Beziehungen tatsächlich verifiziert werden. Dabei tritt nach Zusatz von Mg-Ionen zu einem im alkalischen autoklavierten phosphatgepufferten TTC-Agar eine weit geringere Keimzahlabnahme ein, als ohne diesen Zusatz. Bei Zugabe von Ca-Ionen in Form von CaCl_2 ist dieser Effekt noch deutlicher (s. Abschnitt C).

Für den zuletzt zitierten Versuch über die Wirkung des Phosphatzusatzes vor und nach dem Autoklavieren, wurde ein Agar ohne NaCl- und Phosphatzusatz hergestellt, der ebenso wie der mit ihm zu vergleichende Phosphatagar vor dem Autoklavieren mit n 1 NaOH auf pH 8.0 alkalisiert worden war. Bei diesem pH erfolgte auch bei fehlendem Phosphatzusatz ein wesentlich stärkeres Ausfallen von Substanzen als bei den nur bis pH 7.2 alkalisierten Chargen, die bei allen übrigen Versuchen dieser Arbeit zur Anwendung kamen. Prompt ist auch ein Absinken der Keimzahlen auf diesem stärker alkalisierten Agar zu verzeichnen, was mit dem oben Gesagten völlig in Einklang steht.

b) NaCl-Komponente. Wie weiter oben gezeigt werden konnte, verhalten sich Coli-Keime aus nährstoffreichen Flüssigkeiten im neutralen Bereich unterschiedlich auf TTC-Agar verschiedener Salzkonzentration. Höherer NaCl-Gehalt ruft dabei höhere Keimzahlen hervor. Befanden sich diese Keime jedoch 24 Stunden in sterilem Oberflächenwasser bei +8°, so zeigen sie eine zunehmende Empfindlichkeit gegen höhere NaCl-Konzentrationen. Je länger die Aufbewahrung in sterilem Oberflächenwasser — das vom osmotischen Gesichtspunkt destilliertem Wasser sehr nahe kommt — dauert, um so stärker wird diese Empfindlichkeit. Auch im leicht sauren Milieu bei pH 6,1 macht sich diese Keimzahlabnahme bei Coli-Keimen aus Oberflächenwassersuspensionen bemerkbar. Sie tritt nach 24 Stunden kaum, nach 3 Tagen Aufenthalt im Oberflächenwasser jedoch merklich hervor. Gegenüber den durch die pH-Wahl beeinflussbaren Keimzahlgrößen auf TTC-Agar (wobei einerseits 100 ‰, andererseits 0 ‰ Übereinstimmung

mit dem Vergleichsmedium erreicht werden kann) bewirkt das Fortlassen eines 0,5 bzw. 0,3%igen NaCl-Zusatzes bei dem optimalen pH von 6,1 keine so weitreichenden Keimzahldifferenzen. Sie sind jedoch trotzdem deutlich. So zeigt der Verlauf der Keimzahlkurven auf TTC-Agar, der ohne NaCl- und Phosphatzusatz hergestellt wurde, und TTC-Agar ohne Phosphatzusatz, jedoch mit 0,5% NaCl-Zusatz, nach 3-tägigem Aufbewahren der Keime in sterilem Oberflächenwasser ein rascheres Absinken der Kurven auf dem salzhaltigen Medium als auf dem salzfreien. Der gleichzeitig mitgeprüfte Phosphatagar bleibt noch weiter unterhalb dieser Werte. Der Phosphatagar erhielt hier mit 6,1 das gleiche pH wie die anderen beiden Agarmedien. Wäre er auf pH 7,0 eingestellt gewesen, so wären seine Keimzahlwerte, entsprechend den Befunden in der vorausgehenden Arbeit¹⁷ oder bei Abb. 3, bereits vom ersten Tage an sehr nahe an 0% gelegen. Auffällig ist bei diesen Versuchen, daß sich die 14 geprüften Coli-Stämme in zwei Gruppen teilten, von denen die eine sehr rasch, die andere wesentlich langsamer ihre Keimzahlen gegenüber den gleich 100 gesetzten Agarkeimzahlen verlor. Es gibt also stärker und schwächer empfindliche Stämme von *E. coli*, die sich sowohl durch verschiedene Resistenz im neutralen Bereich (Abb. 1), als auch durch verschiedene Widerstandsfähigkeit gegenüber Tetrazolium auf optimalen Nährböden nach längerer Aufbewahrung in Wasser auszeichnen (Abb. 4a und b).

Durch Umrechnen der TTC-Keimzahlen in Prozente der jeweils nachgewiesenen Agar-Kolonien wurde erreicht, daß der im Laufe von 6 Tagen feststellbare absolute Keimzahlabfall aus der Betrachtung ausschied und die Kurven dadurch bessere Vergleichsmöglichkeiten bieten.

5. Begünstigung des Wachstums durch Aufbewahrung der Keime in Milch, Bouillon oder Wasser höherer Temperatur

Bei höheren Aufbewahrungstemperaturen als 8° zeigt sich eine zunehmende Verwischung der Unterschiede zwischen einem optimalen und einem ungünstigen Nährboden. Während bei 15° noch nach 24 und 48 Stunden geringere Colizahlen auf einem ungünstigen phosphatgepufferten Medium nachgewiesen werden können, unterscheiden sie sich bei 22° kaum und bei 37° überhaupt nicht mehr von denen eines optimalen Agars. Bei 42° gehaltene Keime gehen auf keinem Medium mehr an (Tab. 2).

Ähnlich, wie leicht erhöhte Temperaturen, wirkte das Aufbewahren der Keime in Milch und Bouillon bei niedrigen Temperaturen. Selbst nach 5 bzw. 6 Tagen wiesen alle TTC-Medien, auch der ungünstige phosphatgepufferte Agar, die gleiche Keimzahl wie ein Kontrollagar auf (Abb. 4c). Es erscheint daher als leicht verständlich, daß Coli-Keime aus Milchproben oder anderen nährstoffreichen Medien auch auf relativ ungünstigen

Wachstum gegenüber Vergleichsmedium

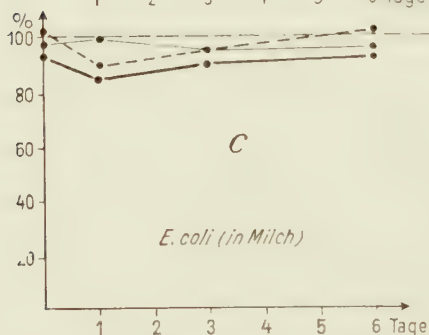
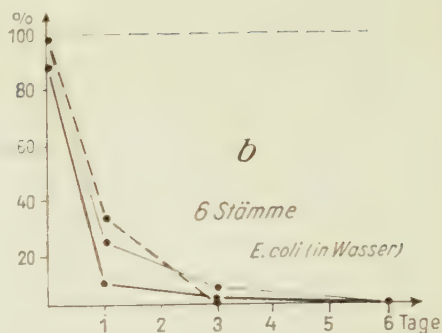
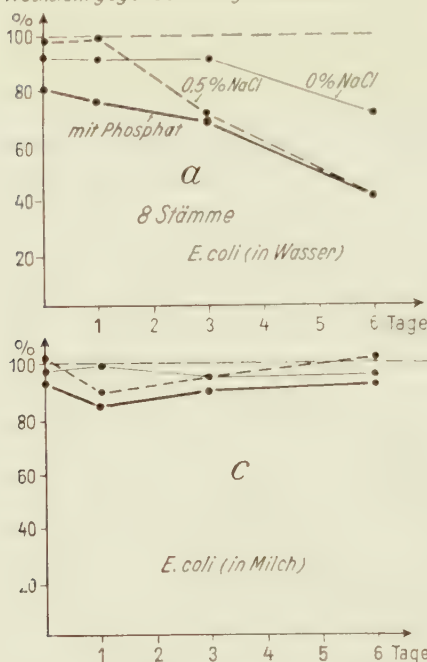


Abb. 4. Vergleichsweiser Keimzahlabfall auf TTC-Agar 1:450. Medien: 1) TTC-Agar, phosphatgepuffert, 0,3% NaCl, alkalisch autoklaviert; pH 6,1; 2) TTC-Agar, ohne Phosphat- und NaCl-Zusatz, neutral autoklaviert; pH 6,1; 3) TTC-Agar, ohne Phosphat-zusatz, 0,5% NaCl, neutral autoklaviert; pH 6,1. Vergleichsmedium: Nähragar. Keime in sterilem Oberflächenwasser bei + 8° bzw. Milch bei + 8° suspendiert, Keimdichte ca 800–1000 Keime/ml.

Tabelle 2

Keimzahlen bei Aufbewahren einer Keimaufschwemmung von *E. coli* in sterilem Oberflächenwasser bei verschiedenen Temperaturen während 24 und 48 Stunden Dauer.

Anschließend Bebrütung der Agarplatten bei 37°. Mittel aus 3 Platten

	8°		15°		22°		37°		42°	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
1. Nähragar	297	191	305	246	599	+++*	110	+++	φ	φ
2. TTC-Agar ohne NaCl- u. Phosphat-zusatz; pH 6,1	270	147	309	233	533	+++	126	+++	φ	φ
3. TTC-Agar mit NaCl u. Phosphat; pH 7,2; im Neutralen autoklaviert.	8	3	195	87	410	+++	132	+++	φ	φ

*) +++ = Rasen

Agarsubstanzen befriedigende Ergebnisse liefern. Sind die Keime jedoch durch längere Aufbewahrung in Wasser bei + 8° gegen TTC so empfindlich geworden, daß sie selbst auf einem optimalen, salzarmen und ungepufferten TTC-Nährboden von pH 6,1 nicht mehr

entwicklungsfähig sind, vermag auch ein Zusatz von Milch zu dem Wasser oder ein Einbringen der abzentrifugierten Keime in unverdünnte Milch von $+8^{\circ}$ diese Schädigung nicht wieder aufzuheben.

Die dabei im Laufe von 48 Stunden nach der Übertragung in Milch leicht gegenüber den Kontrollwerten der weiter in Wasser aufbewahrten Keime ansteigenden TTC-Keimzahlen, betragen auch am Ende dieser Zeitspanne nur einen geringen Bruchteil der Endo-Werte. Es ist zu vermuten, daß die geringen, aber langsam zunehmenden TTC-Keimzahlen solcher Milchproben durch Keime verursacht werden, die aus den bei $+8^{\circ}$ in geringem Maße ablaufenden Teilungsprozessen hervorgegangen sind und erst jetzt, stoffwechselmäßig aktiviert, der Tetrazolhemmung standhalten können.

Die in der vorausgegangenen Arbeit¹⁷ beschriebenen Keimzahlanstiege bei Verwendung eines 20 % Milch enthaltenden TTC-Agars sind mit diesen Befunden nicht zu vergleichen. Abgesehen von dem unterschiedlichen Stoffwechselzustand der Keime (dort lebhaft wachsende Bouillon-Kultur, hier hungernde, ruhende Keime aus Oberflächenwasser) erfolgt zuerst die Milcheinwirkung bei $+8^{\circ}$ und anschließend beim Ausspateln auf TTC-Platten die hemmende TTC-Wirkung, während dort durch das gleichzeitige Vorhandensein von Milch und Tetrazol im Nährboden die hemmende TTC-Wirkung herabgesetzt wird.

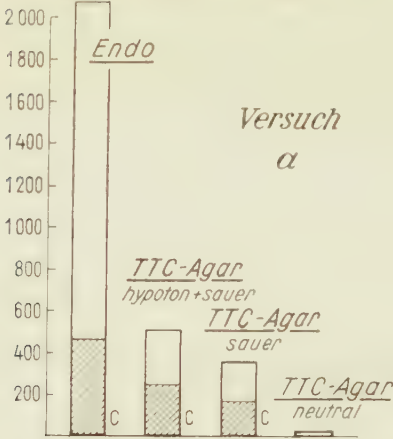
B. Prüfung des optimalen Agars mit Hilfe von Oberflächenwasser

Nach den in den vorausgegangenen Untersuchungen aufgestellten Grundsätzen wurde ein ungepuffertes, saurer TTC-Agar ohne NaCl-Zusatz — im Folgenden als saurer, hypotoner TTC-Agar bezeichnet — hergestellt und gemeinsam mit einem neutralen und einem auf pH 6,1 angesäuerten phosphatgepufferten TTC-Agar auf seine selektivierenden Fähigkeiten hin untersucht. Die Methodik blieb gegenüber den Versuchen 1—3 des Abschnittes C 2. der vorausgehenden Arbeit¹⁷ unverändert. Bei der Auszählung der ENDO-Platten erfuhren jedoch diesmal nur die fuchsinglänzenden Kolonien Berücksichtigung (Abb. 5).

1. Überlegenheit des ungepufferten, sauren TTC-Agars

Die Keimzahlen des neutralen, phosphatgepufferten TTC-Agars wiesen wie bei den ersten Versuchen geringe, nur aus unverdünntem Wasser zu erzielende Werte auf, wobei auch hier wieder der häufige Nachweis von *Ps. aeruginosa* auffällt. Die Keimzahlen der angesäuerten Medien lagen etwa in der Mitte zwischen neutralem, phosphatgepufferten TTC-Agar und ENDO-Platten, wobei aber der saure, hypotone TTC-Agar deutlich dem sauren phosphatgepufferten überlegen war. Nach Differenzierung von je 100 Keimen aller 4 Nährböden verschob sich das Bild weiter zugunsten

Fuchsinglänzende bzw. TTC-Keimzahl/ccm



Fuchsinglänzende bzw. TTC-Keimzahl/ccm

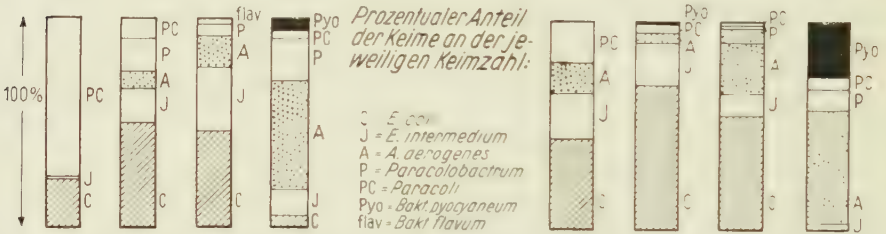
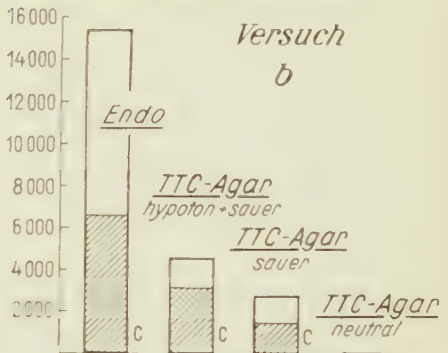


Abb. 5. Nachgewiesene Coll-Zahl aus Oberflächenwasser auf Endo- u. TTC-Agar

des sauren hypotonen TTC-Agars, da sich ein großer Teil der ENDO-Kolonien als Paracoli herausstellte und der saure phosphatgepufferte TTC-Agar besonders bei Versuch Abb. 5 b wesentlich seltener *E. coli* nachwies.

2. Nichterfassung eines Teiles der älteren Keime

Wenn trotzdem nur etwa die Hälfte der auf ENDO feststellbaren Coli-keime mittels des optimalen TTC-Agars erfaßt werden konnten, so lag das wohl in erster Linie daran, daß in Übereinstimmung mit den Versuchen der Keimsuspensionierung in Oberflächenwasser ein Großteil der bereits längere Zeit in Wasser befindlichen und damit stoffwechselmäßig träge gewordenen Keime der zellschädigenden Einwirkung des Tetrazoliums erliegt und nicht mehr zur Ausbildung einer Kolonie fähig ist.

Zusammenfassend ist diesen Versuchen zu entnehmen, daß ein unter optimalen Verhältnissen arbeitender TTC-Nährboden für den Nachweis von *E. coli* aus Wasser selektiv besser wirkt als der gebräuchliche Endo-Agar, aber mehrere Tage in Wasser befindliche Keime von der Erfassung ausschließt.

3. Versuche zur Abgrenzung älterer Keime

Inwieweit die Nichterfassung von Keimen, die sich bereits mehrere Tage in Wasser befunden haben, nicht nur nicht hinderlich, sondern sogar erwünscht und im hygienischen Sinne bedeutungsvoll sein kann, ist aus der Möglichkeit zu ersehen, den Betrag älterer coliformer Kolonien durch vergleichende Keimzahlbestimmungen auf ENDO- und TTC-Platten als Differenzwert zu bestimmen. Wenn es gelingt, den TTC-Agar unter Ausnutzung der NaCl-Empfindlichkeit älterer Keime im neutralen Bereich so einzustellen, daß ein länger in Wasser befindlicher Keim im Gegensatz zu frisch suspendierten nicht mehr nachgewiesen wird, ist damit der wasserhygienischen Untersuchungsmethodik zum ersten Mal ein Mittel in die Hand gegeben, um Coli-Keime aus frischen und alten fäkalen Verunreinigungen zu trennen.

a) Möglichkeit einer altersmäßigen Selektion durch passende Wahl der NaCl-Konzentrationen. Die prinzipielle Möglichkeit dazu ergibt sich aus dem Keimzahlverhältnis frischer und 24 Stunden bei $+8^{\circ}$ suspendierter Coli-Keime auf TTC-Agar von 2 ‰ NaCl-Gehalt bei pH 7,1 (s. Abschnitt A 3). Allerdings ist dieses Verhältnis sehr stark von der jeweils benutzten Nährbodencharge abhängig und es ist praktisch unmöglich, auf dem Wege einfacher Nährbodenherstellung stets die ionenmäßig gleiche Zusammensetzung des Agars zu erzielen, die zur Einführung der Methode als Routineverfahren nötig ist. Ein Beispiel dafür ist in Tabelle 3 zu sehen, welche mit 4 verschiedenen Stämmen von *E. coli* erzielte, erheblich voneinander abweichende Resultate wiedergibt, die auf 2 verschiedenen Nährbodenchargen zustande kamen.

Tabelle 3

Unterschiedliche Geschwindigkeit des Keimzahlabfalls nach mehrtägiger Keimsuspendierung in sterilem Oberflächenwasser von $+8^{\circ}$ auf 2 verschiedenen Nährbodenchargen. Saurer hypotoner TTC-Agar.

Etwa 1000 Keime/ml Oberflächenwasser. Vergleichsmedium Endo.

Stamm nach	ϕ	1	3	6	Tagen Aufbewahrung in Wasser von $+8^{\circ}$
U 1	88 ‰*	21 ‰	—	—	Charge I
U 2	100 ‰	1 ‰	—	—	
U 3	100 ‰	100 ‰	105 ‰	91 ‰	
U 5	99 ‰	82 ‰	102 ‰	61 ‰	
U 1	84 ‰	71 ‰	64 ‰	52 ‰	Charge II
U 2	98 ‰	93 ‰	81 ‰	12 ‰	
U 3	114 ‰	105 ‰	96 ‰	77 ‰	
U 5	99 ‰	94 ‰	90 ‰	41 ‰	

*) TTC-Kolonien in ‰ der Endokolonien.

b) Verbesserung des TTC-Agars durch Ionen-Zusätze. Die Arbeiten zur Entwicklung eines mehr konstanten Nährbodens werden jedoch fortgesetzt, da die Schaffung eines altersmäßig selektivierenden Mediums für die bakteriologische Methodik von Bedeutung erscheint und darüber hinaus genauere Einblicke in den Ionenbedarf der TTC-Reduktion zu erwarten sind. Als vorläufige Ergebnisse sind dabei Versuche zu werten, welche nach Zusatz von Magnesium-, Calcium- und Eisenionen zu einem ungünstigen, phosphatgepufferten und neutralen TTC-Agar ein gesteigertes Wachstum gegenüber Kontrollplatten ohne Ionenzugabe erkennen lassen.

Bei der quantitativen Untersuchung der hierzu erforderlichen Ionenmengen zeigt sich, daß bei bestimmten Konzentrationen auf dem sonst extrem ungünstigen phosphatgepufferten und neutralen TTC-Agar ein hundertprozentiges, also völlig mit dem Kontrollmedium übereinstimmendes Wachstum zu erzielen ist; und zwar auch dann, wenn die Coli-Keime bis 6 Tage bei -8° im sterilen Oberflächenwasser suspendiert waren. Die deutlichste Wirkung wurde dabei durch Zusatz von steriler Calciumchloridlösung erzielt, die dem abgekühlten Agar gleichzeitig mit der erforderlichen TTC-Lösung zugegeben wurden. Bei 0,001 M CaCl_2 stiegen die Keimzahlen, die ohne diesen Zusatz nur 6,0 % der ENDO-Keimzahlen betrugen, auf 30,6 % an, um bei 0,02 M CaCl_2 mit 109,9 % den Wert des Kontrollmediums zu erreichen.

Auch ein Zusatz von Magnesiumsulfat vermochte die Keimzahlen merklich anzuheben; bei 0,008 M MgSO_4 waren bereits 26,6 % gegenüber Endo, bei 0,042 M MgSO_4 64,5 % und bei 0,167 M MgSO_4 80,1 % nachweisbar. Die hohe Konzentration des Magnesiums läßt zuerst an eine osmotische Wirksamkeit denken. Daß diese aber nicht das wirksame Prinzip darstellen kann, geht aus einem Vergleich mit aequimolaren NaCl-Zusätzen hervor, die im Gegenteil zu einem leichten Absinken bei steigender Konzentration führen (vergl. auch A, 4 b).

Eine Kombination von Mg- und Ca-Ionen führt zu einer verstärkten Wirkung. So erreicht z. B. ein 0,1 %iger (0,01 M) CaCl_2 -Zusatz bei Anwesenheit von 0,042 bis 0,167 M MgSO_4 Keimzahlwerte, die sonst erst durch 0,02 M CaCl_2 ermöglicht werden (Tab. 4).

Die Verwendung von zweiwertigem Eisen in den Konzentrationen 0,001 bis 0,02 M bringt eine besonders bei höheren Werten auffallende Reduktion des TTC im Medium mit sich, die selbst bei rascher Abkühlung der Platten nicht verhindert werden kann und die die erzielten Keimzahlanstiege stark überhöht, wenn nicht überhaupt alleine hervorruft.

Auch der in allen bisherigen Versuchen als der für den Nachweis von Wasserkeimen am geeignetsten befundene, saure hypotone TTC-Agar 1 : 450 von pH 6,1 ist durch einen Zusatz von CaCl_2 zu verbessern. Nach Zusatz von Calciumchlorid werden auf ihm völlig mit dem Vergleichsmedium übereinstimmende Colizahlen erreicht. Bei dem eben erwähnten Versuch mit 6-tägigen Coliaufschwemmungen gingen auf ihm

Tabelle 4

Zusatz von Ca- und Mg-Ionen zu TTC-Agar. TTC-Agar 1 : 450 mit Phosphat- und NaCl-Zusatz, alkalisch autoklaviert, pH 6,9

TTC-Agar mit Zusatz			TTC-Agar mit Zusatz		
	Keimzahl pro Platte	%		Keimzahl pro Platte	%
von 0,000 M CaCl_2	17	6,0 %	von 0,000 M MgSO_4	17	6,0 %
0,001 M „	87	30,6 %	0,008 M „	75	26,6 %
0,01 M „	87	30,6 %	0,042 M „	182	64,5 %
0,02 M „	310	109,9 %	0,083 M „	203	72,0 %
			0,125 M „	183	64,9 %
Endo	282	100,0 %	0,167 M „	226	80,1 %

4-stdg. Dextrose-Bouillon-Kulturen von *E. coli* (Stamm U 1), 6 Tage in sterilem Oberflächenwasser von 1 : 8 aufbewahrt. Aussaat 282 Keime/Platte (Mittelwert aus 5 Platten). Vergleichsmedium Endo.

Bei Verwendung eines TTC-Agars von pH 7,2 verliefen alle Kurven flacher und erreichten nicht einmal die Hälfte obiger Werte; bei pH 7,4 lagen sie praktisch in der Nulllinie.

ohne Ionenzusatz 71,2 % der Keime zu Kolonien an. Nach Zusatz von 0,001 M CaCl_2 trat noch keine Änderung dieses Wertes ein. Erst bei 0,005 M ist eine Vermehrung auf 83,0 % und bei 0,02 M ein völliges Übereinstimmen mit dem Vergleichsmedium (ENDO) zu sehen. Magnesiumsulfat führt hier, anders als bei dem phosphatgepufferten neutralen Agar, zu keiner Beeinflussung der Keimzahl (Tabelle 5).

Tabelle 5

Gleicher Versuch wie Tabelle 4.; TTC-Agar 1 : 450, ohne Phosphat- und NaCl-Zusatz, neutral autoklaviert, pH 6,1

TTC-Agar mit Zusatz			TTC-Agar mit Zusatz		
	Keimzahl pro Platte	%		Keimzahl pro Platte	%
von 0,000 M CaCl_2	201	71,2 %	von 0,000 M MgSO_4	201	71,2 %
0,001 M „	202	71,6 %	0,008 M „	223	79,1 %
0,005 M „	234	83,0 %	0,042 M „	206	73,1 %
0,02 M „	290	103,8 %	0,083 M „	223	79,1 %
			0,125 M „	—	—
Endo	282	100,0 %	0,167 M „	220	78,0 %

D. Diskussion

Die Untersuchungen lassen erkennen, daß bei Verwendung routinemäßig hergestellter TTC-Nährböden Schwankungen in den erzielten Colizahlen auftraten, die weit außerhalb üblicher Fehlergrenzen liegen und zu völlig irreführenden Schlüssen Anlaß geben können. Dies liegt, wie gezeigt werden konnte, an dem Stoffwechselzustand von Keimen aus Wasser und an der Zusammensetzung des TTC-haltigen Nährbodens, auf dem eine Entwicklung der Keime zu Kolonien verlangt wird.

Unsere Versuche¹⁷, die mit einem im Routinebetrieb gebräuchlichen Agarnährboden durchgeführt wurden, zeigen einen starken hemmenden Effekt auf Keime, die aus Oberflächenwasser stammen, wobei besonders der Anteil von *E. coli* gegenüber den häufig nachgewiesenen Stämmen von *A. aerogenes* und *Ps. aeruginosa* als sehr gering erschien. Selbst die Verwendung eines Milchagars — wobei besonders an eine Zugabe von entgiftenden Eiweiß für das invertseifenähnliche TTC gedacht wurde — vermochte die Coli-Zahlen nur unwesentlich anzuheben.

Von besserem Erfolg war der Versuch, den bakteriellen Stoffwechsel durch Anbrüten in Agargußplatten erst einmal anzufachen, ehe er der Einwirkung einer wässrigen TTC-Überschichtung ausgesetzt wird.

Unter diesen Bedingungen vermögen nach 2 bis 3 stündiger Anbrütung alle, auch die stoffwechselmäßig inaktivsten Coli-Keime, nach TTC-Zusatz zu Kolonien auszuwachsen, während z. B. TTC-empfindliche *Paracoli* noch nach 3-stündiger Anbrütung jedes Wachstum vermissen lassen. Das Verfahren scheint aber — durch die langen Auftrocknungszeiten der 2%igen TTC-Lösung — zu umständlich, um in der wasserhygienischen Alltagspraxis festen Fuß fassen zu können.

Eine Modifizierung dieses Verfahrens durch die Membranfiltermethode, wobei keimtragende Filterscheiben zuerst für 3 Stunden auf einem laktoschaltigen Nähragar angebrütet und anschließend auf das TTC-Medium übertragen werden, dürfte jedoch bei einfacher Handhabung zur Erzielung optimaler Coli-Zahlen geeignet sein.

In der eingangs zitierten Literatur kommen eine Vielzahl von Faktoren zum Ausdruck, die in der Lage sind, die Menge des durch bakterielle Reduktion gebildeten Formazans zu beeinflussen und damit als Maß für die dehydrierenden Umsetzungen der Zelle zu gelten. Diese Faktoren wirken sich nun auch auf die Größe nachgewiesener Keimzahlen aus, obgleich scharf getrennt werden muß zwischen der allgemein biologischen Fragestellung, unter welchen Bedingungen eine Bakterienzelle ohne Vermehrung zur Formazanbildung fähig ist und der für die Verwendbarkeit des TTC zu Selektivzwecken wichtigen Frage, unter welchen Bedingungen sich eine Bakterienzelle bei TTC-Anwesenheit teilen und eine Kolonie bilden kann.

Auf der einen Seite steht also das Reduktionsprodukt im Mittelpunkt des Interesses, auf der anderen die vitalitätsmindernde Wirkung des unreduzierten Stoffes. Es ist daher verständlich, daß gute Reduktionsbedingungen nicht gleichzeitig gute Wachstumsbedingungen darstellen müssen und daß zur Erzielung optimaler Colizahlen eigene Milieuverhältnisse nötig sind.

In dem gesamten TTC-Agar betreffenden Schrifttum der letzten Jahre ist an keiner Stelle ein Hinweis auf die Bedeutung der Nährbodengrundlage geschehen, sondern stets nur von einem „gewöhnlichen oder üblichen

3 %igen Nähragar“ gesprochen worden. Angesichts der verschiedenen Auslegungsmöglichkeiten, was unter einem solchen Agar zu verstehen ist, ist es nicht verwunderlich, wenn die in verschiedenen Instituten nach scheinbar gleicher Versuchsanordnung gewonnenen Ergebnisse so weit differieren, wie es z. B. im Falle Klein⁶ und Seelemann und Wegener¹⁶ zum Ausdruck kommt.

Die Ergebnisse eigener Versuche, die ursprünglich so schlecht waren wie die von Klein mitgeteilten, waren nach Weglassen der Phosphatkomponeute bei der Nährbodenherstellung sofort günstiger. Sie ergaben zusammen mit einer leichten Ansäuerung des Mediums Kolonienzahlen, die sich mit den Angaben Seelemann und Wegener bei Versuchen mit Keimaufschwemmungen völlig decken. Im neutralen Bereich und bei länger in Wasser gehaltenen Keimen auch bei pH 6,1 zeigte sich dabei eine von Nährbodencharge zu Nährbodencharge wechselnde Empfindlichkeit, die durch sorgfältigste Einhaltung gleicher Herstellungsbedingungen nicht konstant gehalten werden konnte. Es ist also möglich, durch kleine, im Routinebetrieb als geringfügig erscheinende Änderungen in der Nährbodenherstellung zu sehr unterschiedlichen Resultaten zu gelangen, die sich für das TTC-Verfahren wertmindernd auswirken müssen.

Eine sorgfältige Beachtung von fünf, sich aus den vorstehenden Versuchen ergebenden Faktoren vermag diese stets unvermeidlichen Fehlerquellen weitgehend zu kompensieren und für den Fall eines größeren Versehens genügend Sicherheit und Spielraum zu bieten, was für die Übernahme eines Mediums in den Routinebetrieb als unabdingbare Voraussetzung erscheint. Es handelt sich dabei um:

1. Die Verwendung eines ohne Phosphatzusatz hergestellten
2. höchstens bis zu pH 7,2 alkalisierten Agargrundgemisches*, das nach dem Autoklavieren und kurz vor dem Gießen zu Platten
3. auf pH 6,1 eingestellt wird und
4. einen Zusatz von 0,2 % steriler CaCl₂-Lösung, die gemeinsam mit der TTC-Lösung zugegeben wird, enthält.

Im Prinzip wird durch diese Maßnahmen vermutlich das Gleiche, nämlich eine relative Vermehrung frei vorliegender dehydrase-aktivierender Ionen erreicht, denn das Fehlen größerer Phosphatmengen und der Beginn der Sterilisation im neutralen Bereich verhindern auf der einen Seite größere Phosphatausfällungen, während durch eine leichte Ansäuerung des Mediums auf der anderen Seite bereits als Phosphat gebundene Ionen, die im kolloidalen Agar feinst verteilt suspendiert sind, wieder dem bakteriellen Ionenhaushalt nutzbar gemacht werden. Natürlich ist es durchaus möglich,

*) Agargrundgemisch: 10,0 g Liebig's Fleischextrakt
 10,0 g Pepton Merck (aus Fleisch)
 30,0 g Agar-Agar
 1 000,0 ml Aqua dest.

mit einer dieser Maßnahmen allein befriedigende Ergebnisse zu erzielen, jedoch sollte der Wichtigkeit der Sache wegen, auf ein möglichstes Maß an Sicherheit nicht verzichtet werden.

Nach den Versuchen über Keimaufschwemmungen in Wasser bei niedriger Temperatur erscheint außerdem

5. ein Weglassen des Kochsalzzusatzes empfehlenswert, da längere Zeit im Wasser befindliche Coli-Keime in normalen und höheren Salzkonzentrationen eine stärkere Schädigung durch das Tetrazoliumsalz erfahren.

Ein Nachteil in der selektiven Wirksamkeit des TTC-Agars liegt jedoch darin, daß bei den unter Reduktion gewachsenen Kolonien eine morphologische Unterscheidung schwer möglich ist, obgleich eine solche von verschiedenen Autoren angegeben wird. Die bei den entsprechenden Versuchen nach Koloniengröße notierten Keime gelangten bei den eigenen Untersuchungen auf Grund der bunten Reihe nicht in gleiche Keimgruppen; selbst durch ihre Kleinheit oder atypische Randausbildung mit Sicherheit für nichtcoliform erachtete Kolonien stellten sich dabei öfters als echte fäkale Coli mit positiver Indol- und Bulirprobe heraus. Diese fehlende Unterscheidungsmöglichkeit wird sich vor allem dann störend bemerkbar machen, wenn das Untersuchungsgut stärker mit Keimen von *E. freundii* und *A. aerogenes* durchsetzt ist, die beide auf ENDO-Agar durch ihren meist fehlenden Fuchsinglanz ausgeschieden werden können.

Die Erfolge in der verbesserten Erfassung von Coli-Keimen können nicht darüber hinwegtäuschen, daß das TTC-Verfahren auf eine Auslese fermentativ verschieden aktiver Keime hinausläuft, ohne daß die Selektion die meisten coliformen Arten — wenn man von Paracoli absieht — sicher ausschließen würde.

Die Anwendungsmöglichkeit des TTC-Agars, bes. des verbesserten Mediums, zum Nachweis von Keimen, die aus Milch oder sonstigen nährstoffhaltigen Untersuchungsgütern stammen, wird jedoch nicht berührt.

Wenn es außerdem in der Folgezeit gelingt — und die Feststellungen über die Wirksamkeit von Ionenzusätzen berechtigen zu dieser Hoffnung — ein in der Ionenzusammensetzung konstant zu haltendes Medium herzustellen, welches bei einer bestimmten Salzkonzentration und einem bestimmten pH innerhalb enger zeitlicher Grenzen alte fäkale Verunreinigungen von frischen zu unterscheiden gestattet, so kann die auf üblichen TTC-haltigen Medien störende Tatsache der Unterdrückung älterer Keime für sich allein betrachtet, zu einer wünschenswerten Erweiterung unserer bakteriologischen Hilfsmittel führen. An dieser Stelle besitzt das TTC-Medium eine weitere wichtige Aufgabe, zu deren Erfüllung sich auch größere wirtschaftliche und methodische Anwendungen als lohnend erweisen müßten.

Zusammenfassung

1. TTC-Coli-Zahlen aus Wasserproben sind von der Zusammensetzung und der Herstellung des Agarnährbodens abhängig.
2. Die mit den verschiedenen Nährböden erhaltenen Werte differieren gegenüber ENDO als Bezugsmedium oder gegenüber Agar um 0 bis 100 %.

Ein „gewöhnlicher“ Agar ist daher als Grundsubstrat für TTC-Agar in der Wasserdiagnostik nicht anwendbar.

3. Die Ursachen für dieses Verhalten werden untersucht. Sie sind in dem Fehlen von dehydraseaktivierenden Ionen zu suchen, welche bei Phosphatzusatz oder zu starkem Alkalisieren vor der Sterilisation des Nährbodens in erhöhtem Maß als schwer lösliche Phosphatverbindungen ausfallen. Nachträgliches Ansäuern oder Zusetzen von Calciumionen in Form von CaCl_2 vermag dies wieder auszugleichen.
4. Eine Kombination von 4 Maßnahmen: Fortlassen des Phosphatzusatzes, geringes Ansäuern vor dem Sterilisieren und nachträgliches Einstellen des pH kurz vor dem Gießen der Platten auf 6,1, sowie Zugabe von 0,2 % einer sterilen CaCl_2 -Lösung kann als optimale Nährbodenherstellung gelten.
5. Keime, die längere Zeit in Milch oder Bouillon bei niedriger Temperatur gehalten wurden, können auch auf einem für Wasserkeime ungünstigen, phosphatgepufferten TTC-Agar ohne Ionenzusatz nachgewiesen werden.
6. Es ergeben sich Möglichkeiten, einen ionenmäßig konstanten Agar zur Trennung alter und frischer fäkaler Verunreinigungen auszunützen.

Summary

Bacterial counts of water samples obtained on various nutrition media containing TTC differ from those obtained on ENDO's agar by 0—100 per cent. This difference is caused by the absence of ions which activate dehydrogenases and which are precipitated in various amounts during sterilisation. The number of colonies obtained on media containing TTC and on ENDO's agar is identical if no phosphate is added to a medium adjusted to a low pH and if calcium chloride is added simultaneously with the tetrazolium salt. The preparation of a solid nutrition medium containing TTC for the differentiation between previous and recent fecal contamination of water is possible.

Résumé

Le nombre de germes TTC dans des échantillons d'eau diffère dans différents terrains de culture de 0 à 100 % du milieu de référence (ENDO). La cause en est le manque d'ions activant la déshydratation, variant avec les autoclaves. On obtient un nombre normal de coli en supprimant l'addition de phosphates, et par un pH bas et une addition de CaCl_2 et de sel de tétrazolum. Il est possible de produire un TTC-Agar pour séparer les souillures anciennes et fraîches d'origine fécalienne.

Schrifttum

- 1 Bielig, K. u. H., Zschr. Naturforsch. **4b** (1949): 80 — 2 Edlbacher, S. F. u. Leuthardt, Lehrbuch der physiol. Chemie, 11. Aufl., Berlin 1954, S. 278 — 3 Gillissen und Becher, Arch. Hyg. **141** (1957): 403 — 4 Harms, F. u. K. H. Wegener, Arch. Lebensm.-Hyg. **6** (1954): 107 — 5 Jambor, B., Nature **173** (1954): 774 — 6 Klein, H., Berl.-Münch. tierärztl. Wschr. **68** (1955): 58, 133, 143 u. 214 — 7 Knorr, M. u. J. Borneff, Milchwissenschaft **12** (1957): 58 — 8 Kopfer, P. H., J. Bact. **63** (1952): 641 — 9 Lindenmann, J., Schweiz. Zschr. allg. Path. **17** (1954):

311 — 10 *Narahara, H. T., H. Quittner, L. Goldmann u. W. Antopol*, Transact. N. Y. Acad. Sci. **12** (1950): 160 (zit. n. *Lindenmann*) — 11 *Schönberg F.*, (1) *Lebensmitteltierarzt* **2** (1951): 52 — 12. *ders.* (2) *ebda.* **4** (1953): 137 — 13 *ders.* (3) *ebda.* **4** (1953): 176 — 14 *ders.* (4) *ebda.* **4** (1953): 284 — 15 *ders.*, (5) *Arch. Hyg.* **138** (1954): 583 — 16 *Seelemann, M. u. K. H. Wegener*, *Milchwissenschaft* **11** (1956): 51 — 17 *Selenka, F.*, *Arch. Hyg.* **142** (1958): 81 — 18 *Shreenivasamurthy, V.*, *Milchwissenschaft* **8** (1953): 286 — 19 *Stolp, H.*, *Arch. Mikrobiol.* **17** (1952): 209 — 20 *Wallhäußer, K. H.*, *Arch. Mikrobiol.* **16** (1951): 201 — 21 *Wundt, W.*, *Dtsch. Med. Wschr.* **75** (1950): 1471 — 22 *Laxminarayana, H., V. Shreenivasamurthy u. K. K. Iya*, *Ind. J. Dairy Sci.* **10** (1957): 49, ref. n. *Milchwissenschaft* **13** (1958): 136.